



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 15 141 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:  
**C 12 Q 1/68**

⑳ Aktenzeichen: 199 15 141.5  
㉔ Anmeldetag: 26. 3. 1999  
㉓ Offenlegungstag: 28. 9. 2000

DE 199 15 141 A 1

㉑ **Anmelder:**  
Artus Gesellschaft für molekularbiologische  
Diagnostik und Entwicklung mbH, 20459 Hamburg,  
DE  
  
㉒ **Vertreter:**  
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

㉒ **Erfinder:**  
Krupp, Guido, Dr., 24111 Kiel, DE  
  
㉓ **Entgegenhaltungen:**  
US 57 80 273 A

BEST AVAILABLE COPY

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ㉓ **Detektion von Nucleinsäure-Amplifikaten**  
㉔ Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesonde-  
re Verfahren zum Amplifikation und quantitativen Echt-  
zeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchfüh-  
rung der Verfahren.

DE 199 15 141 A 1

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.

Zur Vervielfältigung von Desoxyribonucleinsäuren (DNA) oder Ribonucleinsäuren (RNA) wurden bislang verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie zum Beispiel Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA®), entwickelt. Auf diesen Amplifikationstechniken basierende Assays werden beispielsweise für den hochsensitiven Nachweis und/oder die Quantifizierung von Erregern im medizinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt.

DNA-Amplifikationstechniken wie PCR führen zur Erzeugung großer Mengen amplifizierter Target-DNA (oder über einen initialen Reverse Transkriptase-Schritt zu amplifizierter RNA). Üblicherweise werden die Amplifikationsprodukte nach einer definierten Zeit mit Hilfe von Post-Amplifikationsmethoden – im allgemeinen durch Hybridisierung – nachgewiesen (Endpunktanalyse).

Gemäß einem neuen Ansatz – "TaqMan®" – zur quantitativen PCR wird Fluorescence Resonance Transfer (FRET; vgl. Heid et al., Genome Res. 6 (1996) 986–994) mit doppelt fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden zur Echtzeitdetektion der DNA-Amplifikation vorgeschlagen. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Sonde am Target haften bleibt, bis sie durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase entfernt wird. Die Stringenz ist aufgrund des Temperaturprofils der PCR nur sehr schwer kontrollierbar, und die Lösung dieses Problems durch entsprechende Sondenkonstruktion ist nur unter großem Aufwand denkbar. Ein weiterer Nachteil des TaqMan® ist die Erzeugung eines äquimolaren Signals, d. h., daß pro Amplifikationszyklus nur ein Sondenmolekül pro amplifiziertem DNA Target-Molekül gespalten wird, was ein vergleichsweise schwaches Signal zur Folge hat.

Bei NASBA® handelt es sich – im Gegensatz zur thermozyklischen PCR – um eine homogene, isotherme in vitro Amplifikation (vgl. z. B. T. Kievits et al. J. Vir. Meth. 35 (1991) 273–286), EP 0 329 822 sowie R. Sooknanan et al. in "Molecular Methods for Virus Detection", D. L. Wiedbrauk und D. H. Farkas (Ed.), Academic Press 1995, Kapitel 12, 261–285). Gegenüber anderen Amplifikationsverfahren weisen die NASBA® und andere isotherme Reaktionen den Vorteil auf, daß sie ohne besonderen technischen Aufwand durchgeführt werden können, da die Amplifikation bei einem einzigen Temperaturwert erfolgt und diese Reaktionsbedingungen während des gesamten Prozesses beibehalten werden. Damit verkürzt nicht auch die Dauer jedes Amplifikationsschrittes. In Verbindung mit der z. B. im Vergleich zur PCR hohen Amplifikationseffizienz werden so mit Hilfe der NASBA® und anderer isothermer Amplifikationstechniken hohe Amplifikat-Konzentrationen in kurzer Zeit erreicht. Ein weiterer Vorteil der NASBA® gegenüber der PCR ergibt sich aus der selektiven Nachweismöglichkeit von RNA. Dies spielt insbesondere im Zusammenhang mit der Amplifikation bzw. Quantifizierung von zellulärer mRNA eine Rolle, bei der mögliche zelluläre DNA-Kontaminationen vermieden werden können.

Ein Nachteil der NASBA® und anderer isothermer Amplifikationsstrategien ist jedoch, daß eine Echtzeitdetektion mit Hilfe von Fluoreszenz wie bei dem auf PCR basierenden TaqMan (Perkin Elmer) oder Light-Cycler (Roche Diagnostics) nicht möglich ist.

Die in diesem Zusammenhang vorgeschlagene Endpunktanalyse zur Quantifizierung ist mit Schwierigkeiten verbunden, da im Falle des Nachweises unterschiedlicher Target-RNA-Konzentrationen manche Proben bereits das Sättigungsniveau (Plateauphase) erreicht haben können, während sich andere Proben noch in der Phase steigender Amplifikat-Konzentrationen befinden (vgl. auch Heid et al., a.a.O.). Ferner ist diese Endpunktsanalyse aufgrund zusätzlicher Arbeitsschritte nach der erfolgten RNA-Amplifikation aufwendiger und zeitintensiver. Aufgrund des Erfordernisses, die Reaktionsgefäße für die Quantifizierungsschritte zu öffnen, besteht außerdem das Risiko einer Kreuzkontamination hochamplifizierter RNA- und DNA-Targets.

Von Leone et al. (Nucleic Acids Research 26 (1998) 2150–2155) wurde ein Ansatz zur Echtzeitdetektion von NASBA®-amplifizierter RNA vorgeschlagen, bei dem man eine zweifach fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde verwendet. Im Gegensatz zum PCR-Verfahren (vgl. Heid et al., a.a.O.) haftet die Sonde am Target an und wird bei der Amplifikationsreaktion nicht entfernt. Dies führt zu potentiellen Komplikationen, da die DNA-Sonden während der frühen Amplifikationsstufen mit der Bindung an die ersten Antisense-RNA-Amplifikate interferieren können, was zum RNase H-Abbau und damit zu Eliminierung von RNA-Substraten und in der Folge zu einer fehlerhaften Konzentrationsbestimmung führen kann. Die Genauigkeit der quantitativen Target-Bestimmung hängt ferner in entscheidendem Maß von der Menge der zugesetzten Sonde ab.

Das von Leone et al. vorgeschlagene System erlaubt allerdings nur eine sehr schlechte Quantifizierung, unabhängig davon, ob man die bevorzugte Auswertung auf Basis des Schwellenwerts (vgl. Leone et al., Fig. 7; Kurven für 100 fg und 1 pg überlappen zu Beginn) oder nach Erreichen des Plateaus (vgl. Leone et al., Fig. 7; Kurven für 1 pg und 10 pg überlappen am Ende) durchführt.

Ferner ist nur eine sehr geringe Stringenz möglich, da die Sonde am Target haften bleibt und die isotherme Reaktion bei relativ geringer Temperatur (41°C) erfolgt, was ein hohes Risiko falsch positiver Ergebnisse zur Folge hat. Offensichtlich könnte, abhängig von der Sonde, ein maximales Signal sogar bei geringeren Temperaturen erhalten werden (vgl. Leone et al., Fig. 7), aber aufgrund der gewählten Versuchsdurchführung hätte dies ein zusätzliches Risiko für falsch positive Resultate zur Folge. Wie im Rahmen weiterer Untersuchungen anhand des von Leone et al. vorgeschlagenen Protokolls festgestellt wurde, variiert die optimale Temperatur für die Hybridisierung des Fluoreszenzmarkers in Abhängigkeit von der Länge bzw. der Sequenz des hybridisierenden Target-Abschnitts.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, insbesondere von RNA, zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Methoden, insbesondere des Verfahrens von Leone et al., vermeidet und für Routineanwendungen geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, bei dem man

- a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man  
 b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man  
 c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration " $c_{rel.}$ " nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aufgrund des über den Primer eingeführten bzw. an die Nukleinsäureamplifikate angehängten Sequenzmotivs A und des in der Sonde verwendeten Motivs B die Bildung eines Hammerkopf-Ribozyms ermöglicht, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals. Das erfindungsgemäße Prinzip ist schematisch in Fig. 1 (sowie Fig. 2 bis 16) dargestellt. Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich möglich, Sequenzen auszunutzen, die anstelle des Hammerkopf-Ribozyms zur Ausbildung anderer, kleinerer Ribozyme (z. B. des "Hairpin-Ribozyms" oder des "Hepatitis Delta") geeignet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Quantifizierung von RNA, DNA oder RNA/DNA-Chimären (d. h. Ribo- und Desoxyribonukleotiden enthaltenden Nukleinsäuren), die als "Target-Nukleinsäure" bezeichnet werden, wobei gegebenenfalls eine dem Verfahren vorgeschaltete Aufschmelzung doppelsträngiger Nukleinsäuren zum Erhalt von Einzelsträngen erforderlich ist.

Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten Amplifikationsverfahren handelt es sich vorzugsweise um ein isotherme Amplifikationsverfahren wie NASBA<sup>®</sup>, Transcription Mediated Amplification (TMA; vgl. z. B. M. Hirose et al., J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 3122-6) oder Self-sustained Sequence Replication (3SR; vgl. E. Fahy et al. in PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991, 25-33) oder um cyclische Amplifikationsverfahren wie z. B. PCR.

Soweit hierin nichts anderes angegeben ist kann es sich bei den Nukleotiden A, C und G jeweils um Ribonukleotide (rNTP) oder Desoxyribonukleotide (dNTP) handeln. "N" kann für ein beliebiges Ribo- oder Desoxyribonukleotid stehen. Im Falle von RNA/DNA-Chimären (d. h. Oligonukleotiden, die sowohl Ribo- als auch Desoxyribonukleotide enthalten) sind die obligatorischen Ribonukleotide mit dem Präfix "r" versehen (d. h. rA, rC, rG) bzw. U. Die Sequenzmotive A und B der Sonden können somit entweder ausschließlich aus Ribonukleotiden (RNA-Sonde) bestehen oder RNA/DNA-Chimäre sein. Beim Motiv A ist es jedoch erforderlich, daß am 3'-Ende in jedem Fall das Ribonukleotid Adenin (rA) eingesetzt wird (d. h. 5'-GAA(rA)-3'). Beim Motiv B (5'-CUGANGA-5') ist es erforderlich, daß Guanin als Ribonukleotid vorliegt und Adenin am 3'-Ende ebenfalls ein Ribonukleotid (rA) ist (d. h. 5'-CU(rG)AN(rG)(rA)-3'). U kann gegebenenfalls durch T ausgetauscht sein.

Unter "Fluoreszenz-Schwellenwert" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenz-Wert verstanden, der um den Faktor 5-10 über der unter vergleichbaren Bedingungen (d. h. Reaktionsmischung ohne Target- oder Referenz-Nukleinsäure) gemessenen Hintergrundschwankung liegt.

Die Zeit  $t_p$  entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis so viele Amplifikate der Target-Nukleinsäure gebildet sind, daß der Fluoreszenz-Schwellenwert (Schwellenwert) erreicht ist.

Die Zeit  $t_{Ref.}$  entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis ausgehend von einer Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration so viele Amplifikate gebildet sind, daß der Schwellenwert erreicht ist. Die Referenznukleinsäure sollte in ihrer Nukleinsäuresequenz nur geringfügig von der Target-Nukleinsäuresequenz abweichen, damit eine möglichst genaue Quantifizierung erreicht wird.

Um die Konzentration der Target-Nukleinsäure möglichst exakt bestimmen zu können mißt man vorzugsweise mehrere  $t_{Ref.}$ -Werte für Referenz-Nukleinsäuren unterschiedlicher Konzentration, so daß der gemessene  $t_p$ -Wert möglichst zwischen zwei  $t_{Ref.}$ -Meßpunkten liegt und somit eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann. Vorzugsweise mißt man drei  $t_{Ref.}$ -Werte für eine Referenz-Nukleinsäure bei drei unterschiedlichen Konzentrationen und ermittelt die sich daraus ergebende Meßkurve (Eichkurve). Die Target-Nukleinsäure unbekannter Konzentration kann anschließend durch Bestimmung des  $t_p$ -Wertes durch Vergleich mit der Eichkurve bestimmt werden.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren durchgeführt, indem man die Target-Nukleinsäure in gleichzeitiger Anwesenheit einer oder mehrerer, vorzugsweise von drei Referenz-Nukleinsäuren bekannter Konzentration durchführt, und zur Detektion verschiedene sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal erzeugen. Die Sequenzen der Referenz-Nukleinsäuren in einem Amplifikationsansatz unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und sollten Varianten der Target-Nukleinsäure sein. Auf diese Weise können in einem Reaktionsansatz die  $t_p$ - und  $t_{Ref.}$ -Werte gleichzeitig bestimmt und somit ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand die Konzentration ( $c_{rel.}$ ) der Target-Nukleinsäure bestimmt werden (sogen. "Multiplexing"; vgl. auch US 5,837,501).

Anstelle der Verwendung eines das Sequenzmotiv A enthaltenden Primers und einer das Sequenzmotiv B enthaltenden Sonde ist auch die umgekehrte Kombination gleichermaßen geeignet, d. h. die Kombination aus einem das Motiv B enthaltenden Primer und einer das Motiv A enthaltenden Sonde.

Als Reporter kommen praktisch alle Fluoreszenz-Farbstoffe und insbesondere die in Tab. 17 angegebenen Farbstoffe (vor allem FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue (TIB MOLBIOL) in Frage. Vorzugsweise handelt es sich bei den Reporter-Farbstoffen um Substanzen mit hohem Fluoreszenzsignal (d. h. hoher "Lichtausbeute") bei geringem "Photobleaching".

Als Quencher können Farbstoffe eingesetzt werden, die bei Wellenlängen > ca. 500 nm absorbieren. Unter den in Frage kommenden Substanzen sind TAMRA, LCR, CY-5 oder DABCYL bevorzugt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Reporter/Quencher-Kombinationen bevorzugt, die eine Anregung bei ca. 490 nm und eine Emission bei < ca. 650 nm (TaqMan® SDS 7700, Perkin Elmer) oder < 700 (Light Cycler, Boehringer) gestatten. Die Fluoreszenz kann praktisch mit jedem handelsüblichen Fluorimeter gemessen werden.

Beim Multiplexing bietet sich die Kombination des universellen Quenchers DABCYL mit Reporter-Farbstoffen wie Coumann (emittierte Fluoreszenz bei 475 nm), FAM (emittierte Fluoreszenz bei 515 nm), BODIPY (emittierte Fluoreszenz bei 525 nm), TAMRA (emittierte Fluoreszenz bei 575 nm), Texas Red (emittierte Fluoreszenz bei 615 nm), CY-5 (emittierte Fluoreszenz bei 674 nm) usw. an (vgl. z. B. S. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53).

Sollte die zu amplifizierende Nukleinsäure bereits die Sequenzmotive 5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3' ("Ribozym-Motive") enthalten, kann das Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion erfindungsgemäß ebenfalls durchgeführt werden, wobei – aufgrund des bereits in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motivs – unmarkierte Primer eingesetzt werden, d. h. Primer, an die Motiv A oder Motiv B nicht angehängt sind. Die Detektion erfolgt schließlich, indem man die Nukleinsäure-Amplifikation – vorzugsweise NASBA®, TMA, 3SR oder PCR – in Gegenwart eines Überschusses einer Sonde durchführt, die das jeweils zum in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motiv "komplementäre" Motiv enthält. Unter "komplementäres Motiv" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Motiv verstanden, das abhängig von dem in der Target-RNA enthaltenen Ribozym-Motivs (5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3') zur Ausbildung einer Hammerkopf-Ribozym-Struktur (Hammerhead-Ribozym) erforderlich ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, bei dem man

a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der für das Motiv A im Transkript kodiert, amplifiziert wird, wobei man  
b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration "c<sub>rel</sub>" nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel} = t_p / t_{ref},$$

wobei

t<sub>p</sub> der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

t<sub>ref</sub> für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit erstmals eine quantitative Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren (d. h. RNA, DNA oder RNA-DNA-Chimären) im Rahmen einer isothermen Nukleinsäureamplifikation, z. B. mittels NASBA®, TMA oder 3SR, möglich. Im Falle der NASBA® werden insbesondere die dem System von Leone et al. (a. a. O.) anhaftenden Probleme umgangen. Ferner kommt es nicht zu einer möglichen Konkurrenz zwischen Detektion und Amplifikation, da die Sonde – eine RNA-Substratsonde – nicht am Target haften bleibt sondern abgespalten und freigesetzt wird, wodurch ein nachweisbares Signal erzeugt wird. Ferner ist von Vorteil, daß RNase H die Target-RNA im Hybrid aus RNA-Substratsonde und RNA-Target nicht abbauen kann. Ferner ist die Menge der RNA-Substratsonde nicht kritisch, und sie kann in einem sehr hohen Überschuß, wie z. B. 500 nM gegenüber 2 nM Ribozym-Target oder 0,066 nM Ribozym, eingesetzt werden.

Gegenüber den auf der PCR basierenden Echtzeitverfahren wie TaqMan® oder Light Cycler weist das erfindungsgemäße Verfahren unter isothermen wie unter cyclischen Temperaturbedingungen (PCR) ebenfalls Vorteile auf. Aufgrund der Möglichkeit, im Rahmen eines Amplifikationsschrittes mehrere Sonden zu spalten, kann ein vergleichsweise höheres Signal generiert werden. Dieses führt zu einer höheren Sensitivität der Reaktion und zu einer verkürzten Reaktionszeit. Zudem ist die Signalgenerierung aufgrund der enzymatischen Spaltung grundsätzlich steuerbar. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt in der hohen Spezifität der Reaktion, da nur eine exakte Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zum Spaltungsprozeß und damit zum Entstehen eines signifikanten Signals führt. Ferner ist insbesondere im Vergleich zum TaqMan® keine aufwendige Sondenkonstruktion notwendig, da sich die Sonde nach jedem Spaltungsprozeß von der Zielsequenz löst. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht in der Möglichkeit des Multiplexing.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt aufgrund der enzymatischen Spaltung der Sonde eine sehr gute und exakte lineare Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen Ribozym-System erzeugt die Hybridisierung selbst nur ein sehr schwaches Signal, während jedes in der amplifizierten Nukleinsäure vorhandene Ribozym eine Vielzahl von Nukleinsäure-Substratsonden spaltet. Diese weitere Amplifikation ist sehr spezifisch und erfordert das Vorliegen einer vollständig hy-

bridisierenden Sequenz (vgl. Singh et al., *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 6 (1996) 165–168). Ohne das Risiko, falsch positive Resultate zu erhalten, können Temperatur und sonstige Reaktionsbedingungen optimiert werden, um zu einem maximalen Fluoreszenzsignal zu kommen. Beispielsweise können synthetische Peptide (vgl. Müller et al., *J. Mol. Biol.* 242 (1994) 422–429), CTAB (Nedbal et al., *Biochemistry* 36 (1997) 13552–7) oder GAP-DH (Sioud et al., *J. Mol. Biol.* 257 (1996) 775–789) zugesetzt werden, die die Effizienz, wie z. B. die Hybridisierungsgeschwindigkeit, und die Spezifität der Target-Erkennung erhöhen können.

Gegenüber den im Stand der Technik angewandten oder vorgeschlagenen Amplifikationsverfahren mit Target-Quantifizierung können durch die vorliegende Erfindung die Stabilität der RNA-Sonde erhöht und deren Kosten gleichzeitig reduziert werden. So ist es z. B. möglich, nahezu alle, bei der chemischen Synthese teureren Ribonukleotide durch 2'-Desoxyribonukleotide zu ersetzen, die billiger und gegenüber Abbau (durch längerfristige Lagerung, Einwirkung von Nukleasen, Metallionen wie Magnesium, sowie Hitze usw.; vgl. Bratty et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1216 (1993) 345–359) stabiler sind.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der allgemeinen Ribozym-Struktur und Effizienz des Verfahrens sind unter anderem folgende Modifikationen möglich:

Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, d. h. um mehr Signale bezogen auf die Anzahl amplifizierter Nukleinsäure-Moleküle zu erzeugen, sollte auf den Spaltungsort des Ribozyms die Sequenz UA folgen (vgl. Clouet-d'Orval et al., *Biochemistry* 36 (1997) 9087–9092). Ferner sollte die Position X (vgl. Fig. 4B) die modifizierte Base Pyridin-4-on (vgl. Burgin et al., *Biochemistry* 35 (1996) 14090–14097) enthalten, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Detektionsstufe führt.

Durch das Ersetzen der meisten Ribonukleotide durch Desoxyribonukleotide können die Kosten für eine RNA-Sonde um bis das 10fache gesenkt werden. An vier Positionen sind Ribonukleotide jedoch essentiell, die z. B. in Fig. 2B, 4B, 15 und 16 mit "r" gekennzeichnet sind (vgl. Byang et al., *Biochemistry* 31 (1992) 5005–5009). In den hierin vorhandenen Tabellen werden zur Unterscheidung von Desoxy- und Ribonukleotiden ferner Großbuchstaben (für dNTPs) und Kleinbuchstaben (für rNTPs) verwendet.

Ferner hat sich gezeigt, daß chimäre DNA/RNA Hammerkopf-Ribozyme eine erhöhte katalytische Effizienz und Stabilität aufweisen (N. R. Taylor et al., *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 4559–4565). Dieses Prinzip kann man erfindungsgemäß insbesondere für Amplifikationsverfahren wie z. B. PCR ausnutzen, die bei höheren Temperaturen oder bei cyclischen Temperaturprofilen durchgeführt werden.

Zusätze wie z. B. das Protein GAP-DH (vgl. Sioud et al., *J. Mol. Biol.* 257 (1996) 775–789), kurze synthetische Peptide, die vom Viral coat protein (vgl. Müller et al., *J. Mol. Biol.* 242 (1994) 422–429) abgeleitet sind oder die chemische Substanz CTAB (Netbal et al., *Biochemistry* 36 (1997) 13552–13557) sind geeignet, die Effektivität des Verfahrens im Hinblick auf das Auffinden von in großen Nukleinsäure-Strukturen "versteckten" Targets, d. h. Ribozym-Motiven, zu erhöhen.

Auf Basis der vorliegenden Erfindung ist es erstmals möglich, mehrere verschiedene Targets simultan durch Verwendung entsprechender Ribozym-Sonden mit unterschiedlichen Reporter-Farbstoffen nachzuweisen. Dabei sind Sequenz-spezifische Sonden erforderlich, die selektiv an den jeweils nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren anhaften und bei Ribozym-Spaltung Fluoreszenz-Signale unterschiedlicher Wellenlänge erzeugen. Beispielsweise ist es möglich, den Quencher DABCYL mit Reporter-Farbstoffen, wie z. B. Cumann (Fluoreszenzemission bei 475 nm), FAM (Fluoreszenzemission bei 515 nm), BODIPY (Fluoreszenzemission bei 525 nm), TAMRA (Fluoreszenzemission bei 575 nm), Texas red (615 nm), CY-5 (674 nm) usw., zu kombinieren (vgl. Tyagi et al., *Nature Biotech.* 16 (1998) 49–53). Mit diesem sogenannten "Multiplexing" ist es somit möglich, innerhalb eines Reaktionsansatzes gleichzeitig eine Target-RNA sowie mehrere Referenzproben bekannter Konzentration, deren Sequenzen sich im Primer-bindenden Abschnitt jeweils geringfügig voneinander unterscheiden, zu amplifizieren, wobei durch Sequenz-spezifische Sonden, die unterschiedliche Reporter/Quencher-Kombinationen tragen, eine Quantifizierung erfolgen kann, ohne daß getrennte Amplifikationen und Fluoreszenzmessungen mit den RNA-Referenzproben durchgeführt werden müssen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung der oben genannten Verfahren, der entweder

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (oder 5'-CUGANGA-3') im Transkript kodiert,
- b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
- c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikationsreaktion,
- d) eine Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt,

oder

- a) zwei Amplifikationsprimer,
- b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
- c) eine Nukleinsäure-Sonde vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

Gemäß einem Teilaspekt der vorliegenden Erfindung werden erstmals ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung gestellt.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide) in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweisen muß und man die Nukleinsäure durch Erhalt eines der Wahl der Reporter- und Quencher-Moleküle entsprechendes Fluoreszenzsignals nachweist.

Ein erfindungsgemäßer Kit zur Durchführung dieses Nachweisverfahrens umfaßt neben zur Durchführung der Reaktion erforderlichen Lösungsmittel und Reagenzien eine Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül (s. o.) angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

Für den Fall, daß die Target-Nukleinsäuren keines der Sequenzmotive A oder B enthalten, kann die Nukleinsäure nachgewiesen werden, indem eines der Motive z. B. durch Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung eines oben genannten Primers eingeführt wird. Zur Detektion ist eine entsprechende doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde (s.o.) erforderlich, die ein zur Ribozym-Bildung geeignetes Sequenzmotiv enthält.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits wird – mit oder ohne Einsatz einer Nukleinsäure-Amplifikation – eine neue Methode zum Erreger-Nachweis zur Verfügung gestellt. Wie im folgenden angegeben enthält beispielsweise die 16S rRNA vieler Erreger-Spezies bereits natürlicherweise ein 5'-GAAA-3' Ribozym-Motiv, das zur Bildung des Hammerkopf-Ribozyms ausgenutzt werden kann. Falls die Nukleinsäuren der Erreger keine zur Ausbildung von Ribozymen geeignete Sequenzmotive enthalten können diese, wie oben angegeben, im Rahmen der Amplifikationsstufen durch Verwendung entsprechender Primer eingeführt bzw. "addiert" werden.

## GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 16S rRNA	70-100	115-145	145-175	180-210
<i>E. coli</i>	---	taatgtcttggGAAAcctgctgtag	ataactacigGAAAcggttagctaa	---
<i>Salmonella</i>	---	taatgtcttggGAAAcctgctgtag	ataactacigGAAAcggttagctaa	---
<i>Staphylococcus</i>	---	---	ataactcggGAAAcggttagctaa	gttcaaaagGAAAcggttagctg
<i>C. perfringens</i>	tftccctcggGAAAcggttagctg	---	ataactcctccGAAAcggttagctaa	tcaataatgtGAAAcggttagctaa
<i>Vibrio</i>	taatgtcttggGAAAcggttagctg	taatgtcttggGAAAcggttagctg	ataactcctcggGAAAcggttagctaa	---
<i>B. cereus</i>	---	---	ataactcctcggGAAAcggttagctaa	cgtatgtgtGAAAcggttagctg
<i>C. botulinum</i>	---	---	ataactcctcggGAAAcggttagctaa	---
<i>Campylobacter</i>	---	---	ataactcctcggGAAAcggttagctaa	gttgaatgtGAAAcggttagctg
<i>Yersinia</i>	---	taatgtcttggGAAAcggttagctg	ataactcctcggGAAAcggttagctaa	---
<i>Listeria</i>	---	---	ataactcctcggGAAAcggttagctaa	ccatgtcttGAAAcggttagctg

Region in E.coli 16S rRNA	370-400	485-515	595-625	625-655
<i>E. coli</i>	---	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	---
<i>Salmonella</i>	---	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	aatgtcttGAAAcggttagctg
<i>Staphylococcus</i>	cgtatgtgtGAAAcggttagctg	taactaatcaGAAAcggttagctg	agtcaatgtGAAAcggttagctg	aggtgtcattGAAAcggttagctg
<i>C. perfringens</i>	aggtgtcattGAAAcggttagctg	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	---
<i>Vibrio</i>	---	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	naatgtcattGAAAcggttagctg
<i>B. cereus</i>	cgtatgtgtGAAAcggttagctg	taactaatcaGAAAcggttagctg	agtcaatgtGAAAcggttagctg	aggtgtcattGAAAcggttagctg
<i>C. botulinum</i>	cgtatgtgtGAAAcggttagctg	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	---
<i>Campylobacter</i>	cgtatgtgtGAAAcggttagctg	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	naatgtcattGAAAcggttagctg
<i>Yersinia</i>	---	---	agtcaatgtGAAAcggttagctg	aggtgtcattGAAAcggttagctg
<i>Listeria</i>	cgtatgtgtGAAAcggttagctg	taactaatcaGAAAcggttagctg	agtcaatgtGAAAcggttagctg	aggtgtcattGAAAcggttagctg

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Region in	650-680	660-690	685-715	755-780
E.coli 16S rRNA				
E. coli	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Salmonella	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Staphylococcus	ttgGAAAcgGAAAcctgagcgc	tgcaagagcggGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
C. perfringens	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Vibrio	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	---
B.cereus	---	tgcaagagcggGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
C. botulinum	---	tgcaagagcggGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Campylobacter	---	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Yersinia	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Listeria	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga

Region in	895-925	1000-1050	1065-1095	1245-1275	1305-1335
E.coli 16S rRNA					
E. coli	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	---	---
Salmonella	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	---	---
Staphylococcus	cgcgaaggcGAAAcacaaaggaa	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	---
C. perfringens	---	gagcagcggcGAAAcacaaaggaa	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Vibrio	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
B.cereus	cgcgaaggcGAAAcacaaaggaa	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
C. botulinum	---	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Campylobacter	---	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Yersinia	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga
Listeria	cgcgaaggcGAAAcacaaaggaa	---	---	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga	gagcagcggcGAAAGcgcgtagaga



## GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 16S rRNA	70-100	115-145	145-175	180-210
<i>S. aureus</i>	---	---	ataactcggGAAAcggagctaa	gttcaaatgGAAAgagcgttgg
<i>S. epidermidis</i>	---	---	ataactcggGAAAcggagctaa	gttcaaatgGAAAgagcgttgg
<i>S. pneumoniae</i>	---	---	ataactattgGAAAcgalagctaa	---
<i>S. pyogenes</i>	---	---	ataactattgGAAAcgalagctaa	---
<i>E. faecalis</i>	cactcnaatgGAAAgaggagtggc	---	ataacacatgGAAAcaggtagctaa	gcataagagtGAAAgggcgttgg
<i>N. meningitidis</i>	---	---	ataactgatcGAAAgatcaggctaa	tcctgagagGAAAgcaggggacc
<i>E. coli</i>	---	taatgcggGAAAcgtcctatg	ataactacigGAAAcggtagctaa	---
<i>Enterobacter spec.</i>	---	taatgcctggGAAAcgtcggatgg	ataactacigGAAAcggtagctaa	---
<i>Proteus spec.</i>	---	ggtaacaggGAAAcgttgccttc	ataactacigGAAAcggtagctaa	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	ataacgttcggGAAAcggcgcctaa	tcctgagggGAAAgtcggggatc
<i>P. fluorescens</i>	---	---	ataacgttcggGAAAcggcgcctaa	tcctacgggGAAAgcagggggacc
<i>P. mendocina</i>	---	---	ataacgttcGAAAggzaacgtctaa	tcclacgggGAAAgcagggggacc
<i>P. syringae</i>	---	---	ataacgttcGAAAcggcgcctaa	tcclacgggGAAAgcagggggacc
<i>H. influenzae</i>	---	ggtagcaggGAAAcgttgccttc	ataactacigGAAAcggtagctaa	taaggggggGAAAcgttgccttc
<i>H. ducreyi</i>	---	---	ataactcggGAAAcgttagctaa	---
<i>Bacteroides spec.</i>	---	---	atagccttcGAAAgagattaa	---

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Region in E.coli	370-400	450-480	485-515	595-625	625-655
16S rRNA					5
S. aureus	cgcaatgggcGAAAgcclgacgga	...	laacdaatcaGAAAgccacgggcta	agctcgaatgGAAAgccacgggct	agggtcattgGAAAcigGAAaact
S. epidermidis	cgcaatgggcGAAAgcclgacgga	...	laacdaatcaGAAAgccacgggcta	agctcgaatgGAAAgccacgggct	agggtcattgGAAAcigGAAaact
S. pneumoniae	...	tgctgagatgGAAAgctcacacag	laacdaatcaGAAAgccacgggcta	...	gttaggtcattgGAAAcigGAAaact
S. pyogenes	...	ggctgagatgGAAAgcclgacgga	laacdaatcaGAAAgccacgggcta	...	gttaggtcattgGAAAcigGAAaact
E. faecalis	ggctgagatgGAAAgcclgacgga	...	laacdaatcaGAAAgccacgggcta	agctcgaatgGAAAgccacgggct	agggtcattgGAAAcigGAAaact
N. meningitidis	...	tgctgagatgGAAAgcclgacgga	...	agcaggatgGAAAcicccgggct	...
E. coli	...	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
Enterobacter spec.	...	...	...	aagtcgaatgGAAAcicccgggct	aactgcaatgGAAAcigGAAaact
Proteus spec.	...	...	...	ugtcgaatgGAAAgccacgggct	aactgcaatgGAAAcigGAAaact
P. aeruginosa	...	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
P. fluorescens	gacaatgggcGAAAgcclgacgga	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
P. mendocina	gacaatgggcGAAAgcclgacgga	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
P. syringae	gacaatgggcGAAAgcclgacgga	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
H. influenzae	cgcaatgggcGAAAgcclgacgga	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
H. ducreyi	cgcaatgggcGAAAgcclgacgga	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	...
Bacteroides spec.	...	...	...	agctcgaatgGAAAcicccgggct	aactgcaatgGAAAcigGAAaact

Region in E.coli 16S rRNA	650-680	660-690	685-715	715-745	755-780
<i>S. aureus</i>	UUGAAACUGGAAACUAGGAGG	UGCAGAGAGGAAAGUGGGAATCC	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>S. epidermidis</i>	UUGAAACUGGAAACUAGGAGG	UGCAGAGAGGAAAGUGGGAATCC	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>S. pneumoniae</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	CACUGGUGGUGGAAAGUGGUGGAG	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>S. pyogenes</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	CACUGGUGGUGGAAAGUGGUGGAG	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>E. faecalis</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>N. meningitidis</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>E. coli</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>Enterobacter spec.</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>Proteus spec.</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>P. fluorescens</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>P. mendocina</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>P. syringae</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>H. influenzae</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>H. ducreyi</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG
<i>Bacteroides spec.</i>	---	---	UUGTAGCUGGUGAAAGUGCAGAGAGA	---	UGUGAGUGGUGGAAAGUGGUGGAG

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Region in E.coli 16S rRNA	845-875	895-925	1065-1095	1245-1275	1400-1430
<i>S. aureus</i>	---	ccgcaaggctGAAAcTcaaggaa	---	aaaggcagcGAAAccgagggtc	---
<i>S. epidermidis</i>	---	ccgcaaggctGAAAcTcaaggaa	---	aaaggtagcGAAAccgagggtc	---
<i>S. pneumoniae</i>	---	ccgcaaggctGAAAcTcaaggaa	---	---	---
<i>S. pyogenes</i>	---	ccgcaaggctGAAAcTcaaggaa	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	---	ccgcaaggctGAAAcTcaaggaa	---	---	---
<i>N. meningitidis</i>	gttaacgcgGAAAtgaccgct	---	---	---	---
<i>E. coli</i>	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgttgggtta	---	---
<i>Enterobacter spec.</i>	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgttgggtta	---	---
<i>Proteus spec.</i>	---	---	tcgttgtgtGAAAtgttgggtta	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	---	---	---
<i>P. fluorescens</i>	---	---	---	---	---
<i>P. mendocina</i>	---	---	---	---	---
<i>P. syringae</i>	---	---	---	---	---
<i>H. influenzae</i>	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgttgggttn	gcgaatctcaGAAAtgttgcattaa	---
<i>H. ducreyi</i>	---	---	ctcgtgtgtGAAAtgttgggttn	---	---
<i>Bacteroides spec.</i>	---	ccgcaaggctGAAAcTcaaggaa	---	---	gaattatgtGAAAcattgtatgcc

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

### Beschreibung der Figuren

- Fig. 1:** Allgemeines Schema der NASBA® kombiniert mit Ribozymen zur Echtzeitdetektion. Ribozym-Motiv innerhalb eines der zwei Primer. Es ist nur eine Möglichkeit gezeigt, bei der sich das Ribozym-Motiv am 3'-Ende der amplifizierten RNA befindet. Die RNA Substrat-Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dem Reporter (Kreis) und einem Quencher (Dreieck). In der intakten Sonde führt die effiziente Wechselwirkung beider Labels zum "FRET" or Quenching, d. h. zu keinem (or nur sehr schwachem) Reporter-Signal (leerer Kreis). Das Ribozym spaltet viele Sonden-Moleküle. In der gespaltenen Sonde werden beide Labels getrennt, und es wird ein starkes Reporter-Signal erzeugt (gefüllte Kreise).
- Fig. 2A:** Allgemeine Struktur von Hammerkopf-Ribozymen. Es sind nur konservierte Nukleotide mit entsprechenden Buchstaben bezeichnet, alle nicht-konservierten Positionen sind mit N angegeben. Die Länge der hybridisierenden Arme können den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden. Drei Orte möglicher Hairpin-Schleifen sind durch gepunktete Linien dargestellt. Die Polarität (5'-3' Richtung) ist nur für den gespaltenen Abschnitt angegeben. B: Entspricht Fig. 2A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.
- Fig. 3:** Eine Möglichkeit zur Aufspaltung eines minimalen Ribozyms und einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv wurde auf GAAA verkürzt.
- Fig. 4:** A: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher (einige wenige Möglichkeiten sind unten angegeben) an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden. B: Entspricht Fig. 4A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.
- Fig. 5:** Eine weitere Möglichkeit zur Aufspaltung einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv ist auf CUGA-N-GA reduziert.
- Fig. 6:** Basierend auf der in Fig. 5 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden (vgl. Fig. 4).
- Fig. 7:** Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge des Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.
- Fig. 8:** Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.
- Fig. 9:** Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung, gefolgt von einem sehr kurzen 3'-terminalen basengepaarten Abschnitt. Wie gezeigt ist, kann dieser Abschnitt mit dem Ribozym-Motiv überlappen, und die Ausbuchtung kann so kurz sein, daß sie nur ein Nukleotid umfaßt. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.
- Fig. 10:** Basierend auf der in Fig. 2B dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung gefolgt von einer einzigen rA-T Basenpaarung mit der Target-Sequenz. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.
- Fig. 11:** Entspricht der in Fig. 10 dargestellten Möglichkeit. Hier enthält die Target-Sequenz jedoch bereits einen längeren Stretch des Ribozym-Motivs (oder, wie gezeigt, des vollständigen Motivs).
- Fig. 12:** Beispielhafte Struktur eines DNazyms (= katalytische DNA). Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rA vorhanden sein.
- Fig. 13:** Beispielhafte Struktur eines weiteren DNazyms. Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rKrY vorhanden sein.
- Fig. 14:** Entspricht Fig. 10, wobei der Primer den überwiegenden Teil des NAzym-Motivs (des katalytischen Nukleinsäure-Motivs) enthält und nur die zwei letzten Nukleotide fehlen. Gezeigt ist hier eine Möglichkeit basierend auf "Prototyp A". Für "Prototyp B" ermöglicht das Vorliegen längerer Motive (z. B. TCGTTG statt TCGT) ein deletierteres Motiv im Primer einzusetzen, wobei das 3'-terminale ACCG im elongierten Primer durch die Target-Sequenz geliefert wird.
- Fig. 15:** Beispiel für eine universelle Ribozym-Sonde.
- Fig. 16:** Beispiel für eine HIV Ribozym-Sonde.
- Fig. 17A-C:** Für die erfindungsgemäße Echtzeitdetektion als Reporter/Quencher geeignete Farbstoffe.

### BEISPIELE

#### Material

Die im Rahmen der Erfindung eingesetzten Primer und Sonden sind auf dem Fachmann geläufigem Wege erhältlich, wie z. B. durch Oligonukleotidsynthese.

## Beispiel 1

## NASBA®-Reaktion in Kombination mit Ribozym-abhängiger Detektion

- 5 Alle Enzyme waren kommerziell von Pharmacia erhältlich, ausgenommen AMV-Reverse Transkriptase, die von Seikagaku bezogen wurde.
- 23 µl NASBA® Reaktionsmischung, davon 5 µl aus der Aufreinigung nach Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503) (finale Konzentration in 25 µl Reaktionsmischung: 40 mM Tris, pH 8,5, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 42 mM KCl, 15% v/v DMSO, 1 mM jedes dNTP, 2 mM jedes NTP, 0,2 µM Primer 1, 0,2 µM Primer 2 und 0,1-0,5 µM Substrat-Sonde) wurden bei 65°C für 5 Minuten inkubiert um eine Destabilisation der Sekundärstrukturen in der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde für das Primer-Annealing auf 41°C abgekühlt. Die Amplifikation wurde durch Zugabe von 2 µl Enzym-Mischung (0,1 µg/µl BSA, 0,1 Einheiten RNase H, 40 Einheiten T7 RNA Polymerase und 8 Einheiten AMV Reverse Transkriptase) gestartet. Die Reaktion wurde bei 41°C für 90 Minuten inkubiert. Während der Reaktion wurden die Fluoreszenzsignale im ABI Prism 7700 Sequence Detector gemessen. Als Reporter/Quencher wurde die Kombination FAM/TAMRA eingesetzt.

## Experiment A

- Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'
- 20 Primer 2: 5'-GAA TCT CAT CAG TAG CGA GTG GGG GGA CAT CAA GCA GCC ATG CAA A-3'
- Substrat A: 5'-TAMRA-Tga auc gaa cga aag cgu cua gcg u-FAM-3'

## Experiment B

- 25 Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'
- Primer 2: 5'-ACG TAG TTT CGG CCT TTC GGC CTC ATC AGC GTG CAG TGG GGG GAC ATC AAG CAG CCA TGC AAA-3'
- Substrat B: 5'-TAMRA-Tac gua guc cgu gcu-FAM-3'

## 30 Quantifizierung

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

- 35 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)
- Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
- Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)
- Q4 ca. 1000 Moleküle (RNA)

- 40 Die Experimente A und B führten zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach t = 15 Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde (5 × Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach t = 20, 24 und 26 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca. t = 18 und t = 23 Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 200 000 (t = 18) bzw. 15 000 (t = 23). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

## 50 Beispiel 2

Universelle Erkennung beliebiger (full-size) amplifizierter RNA-Targets (ribozyme motive in reverse primer). Die entsprechende "Universelle Ribozym-Sonde" wurde dem NASBA®-Amplifikationskit zugesetzt.

- An seinem 3'-Ende enthält der reverse Primer die übliche Target-spezifische Sequenz (N) und zusätzlich an seinem 5'-Ende eine Sequenz, die für das allgemeine universelle Ribozym-Motiv codiert:
- 55 5'-GCG TTT CGA TTC CNN NNN N...

Das Transcript endet mit der Sequenz

5'... N NNN NNG GAA UCG AAA CGC

Die Ribozym-Sonde wies folgende Sequenz auf:

- 60 5'-GCG UC - U AGC GGA AAC GCU ACU GAX GAG AUU CC (32-mer) - Spaltungsort

Zwei Farbstoffe, 5'-Q und 3'-R (oder 3'-Q und 5'-R) waren mit den Enden verknüpft.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

- 65 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)
- Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
- Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)

Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 2 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach  $t = 12$  Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde ( $5 \times \text{Std.dev. des Backgrounds}$ ). Die weiteren Standards erreichten nach  $t = 18, 22$  und  $25$  Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 100 000 ( $t = 18$ ) bzw. 8000 ( $t = 23$ ). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

Diese Beispiel-Sonde kann an einem oder beiden Enden durch mehr Basen-gepaarte Nukleotide verlängert sein.

### Beispiel 3

Spezifische Erkennung einer amplifizierten Target Sequenz: proximal zu einem der Primer.

Das vorliegende spezifische Beispiele anhand einer NASBA®-gestützten Detektion von HIV (entspr. USP 5,837,501) durchgeführt.

Amplifiziertes Segment der HIV-RNA:

agtggggggacatcaagcagctatgcaaa(c,t)gttaaaagatactatcaatgaggaagc-  
tgcagaatgggacagggtacatccagtagcatgcagggcctattccaccaggccagatgaga-  
gaaccaaggggaagtgcatagca

(es ist nur ein Strang gezeigt, die Primer-Sequenzen sind unterstrichen). Die proximale Sequenz ist ebenfalls hoch konserviert und schließt den folgenden Abschnitt ein:

agcagctatgGaaa(c,t)gttaaaaga

Der Vorwärtsprimer zur Einführung der T7 Promotor-Sequenz (Großbuchstaben) and 1 Punktmutation (fettgedruckter Großbuchstabe):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGG**g**agtggggggacatcaagcagctatgGaaa

Das Transkriptionsprodukt enthält das GAAA Ribozym-Motiv, das mit der proximalen HIV-spezifischen Sequenz verknüpft ist:

GGG**agcagctatgGaaa**(c,t)gttaaaaga....

Es kann insbesondere mit der komplementären Ribozym-Sonde, entsprechend dem allgemeinen Versuchsprotokoll durchgeführt werden.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)

Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)

Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)

Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 3 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach  $t = 22$  Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde ( $5 \times \text{Std.dev. des Backgrounds}$ ). Die weiteren Standards erreichten nach  $t = 24, 28$  und  $33$  Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca.  $t = 18$  und  $t = 23$  Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 400 000 ( $t = 23$ ) bzw. 10 000 ( $t = 28$ ). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

### Beispiel 4

#### A. GAAA in rRNA-Abschnitten zur spezifischen Detektion von Bakterien-Spezies

In den obigen Tabellen sind die wichtigsten, durch Lebensmittel übertragene Pathogene aufgeführt.

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert) liegen zwischen den Positionen 110 and 700 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor.

Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: 110f and 700r [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New

York: Wiley), pp. 115–175].

## B. Spezifischen Detektion von Sepsis-Erregern

5 In den obigen Tabellen sind ferner die wichtigsten Sepsis-Erreger aufgeführt.

Einzartige Sequenzmotive (schattiert), die erfindungsgemäß ausgenutzt werden können liegen zwischen den Positionen 110 and 530 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor. Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Wiley), pp. 115–175].

10 Die in der 16S rRNA enthaltenen Sequenzmotive können für die erfindungsgemäßen Verfahren ausgenutzt werden, so daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verfahren zum Nachweis von Erregern, insbesondere von Sepsis-Erregern und Lebensmittelkeimen, und dafür vorgesehene Kits zur Verfügung gestellt werden.

## Patentansprüche

15

1. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

20

a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei

25

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration " $C_{rel.}$ " nach folgender Formel bestimmt:

30

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

35

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

2. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

40

a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) im Transkript kodiert, wobei

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

45

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration " $C_{rel.}$ " nach folgender Formel bestimmt:

50

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

55

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

3. Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Nukleinsäure, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

60

a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv A enthält, amplifiziert wird, wobei man

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration " $C_{rel.}$ " nach folgender Formel bestimmt:

65

$$C_{rel.} = t_p / t_{Ref.},$$



wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

4. Verfahren zur Amplifikation und zum quantitativen Nachweis einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv B enthält, amplifiziert wird, wobei man

b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration " $c_{rel.}$ " nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_p / t_{Ref.}$$

wobei

$t_p$  der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

$t_{Ref.}$  der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA®, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.

12. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

13. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.

16. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.

18. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er

a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' im Transkript kodiert,

b) einen weiteren Amplifikationsprimer,

c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation

d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CU-GANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.

19. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-CU-GANGA-3' im Transkript kodiert,  
 b) einen weiteren Amplifikationsprimer,  
 c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation  
 d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls  
 e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er  
 a) zwei Amplifikationsprimer,  
 b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,  
 c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CU-GANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls  
 d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
21. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er  
 a) zwei Amplifikationsprimer,  
 b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,  
 c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls  
 d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
22. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
23. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
24. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
25. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
26. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA®, TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zur Durchführung einer NASBA® ist, wobei die Enzyme die Aktivität von Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H aufweisen.
29. Kit nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme zur Durchführung der NASBA® Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H sind.
30. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sonde mit einer zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls weitere zur Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
31. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Reporter ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und der Quencher ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR ist.

---

Hierzu 21 Seite(n) Zeichnungen

---

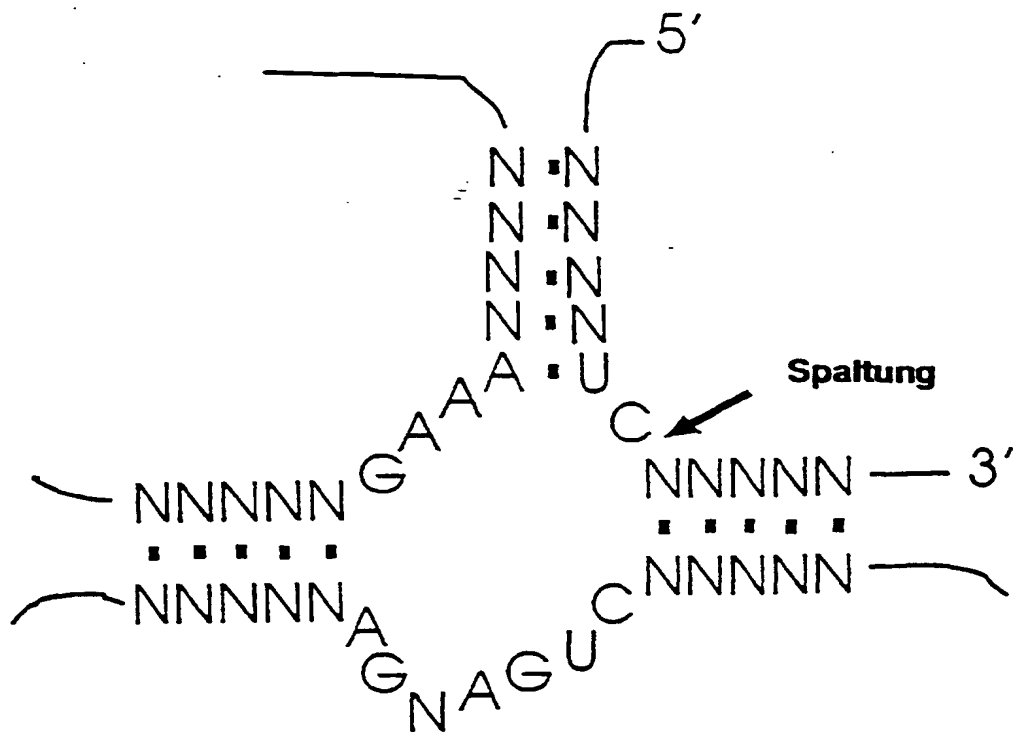
- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

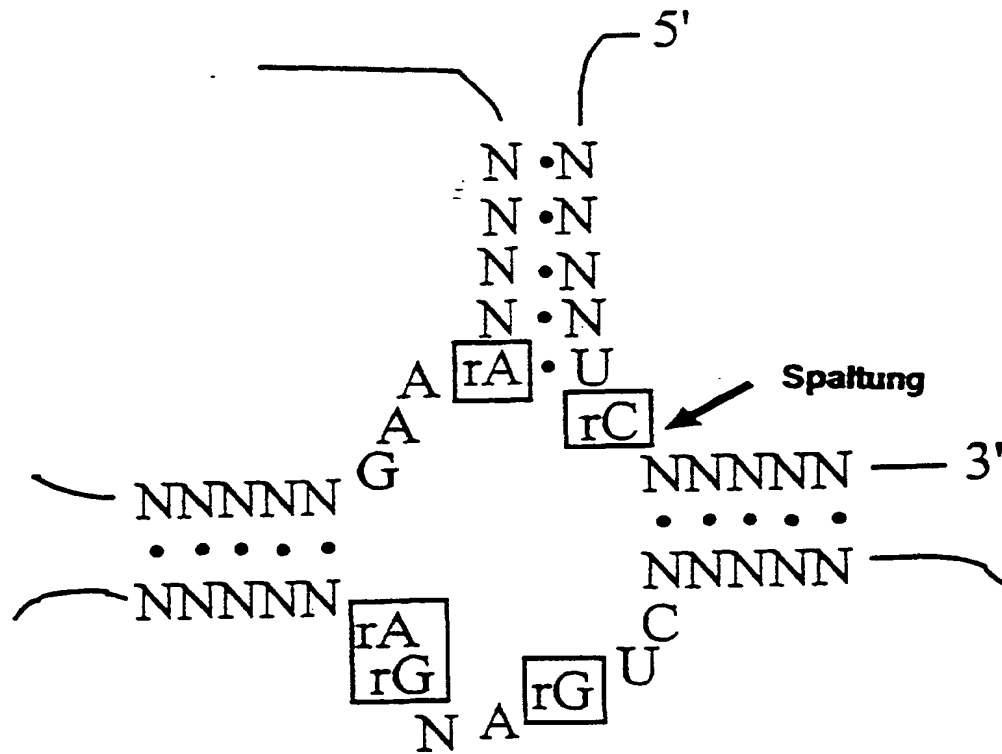
(nucleic acid sequence-based amplification)



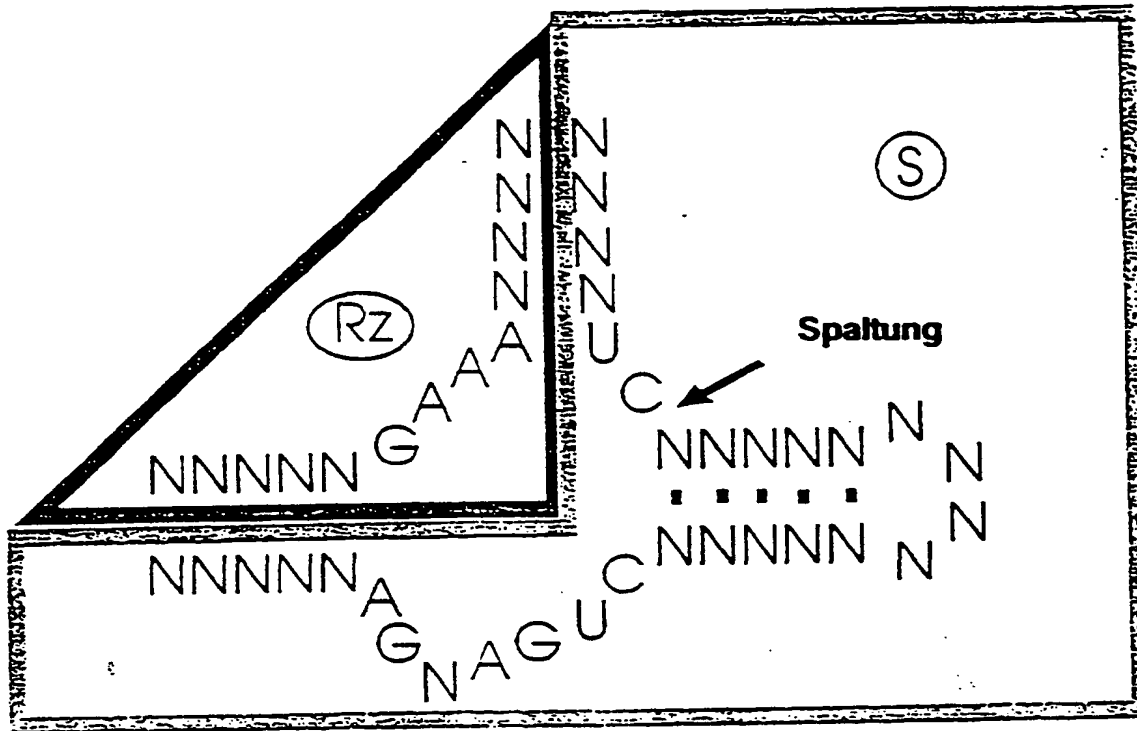
Figur 2A



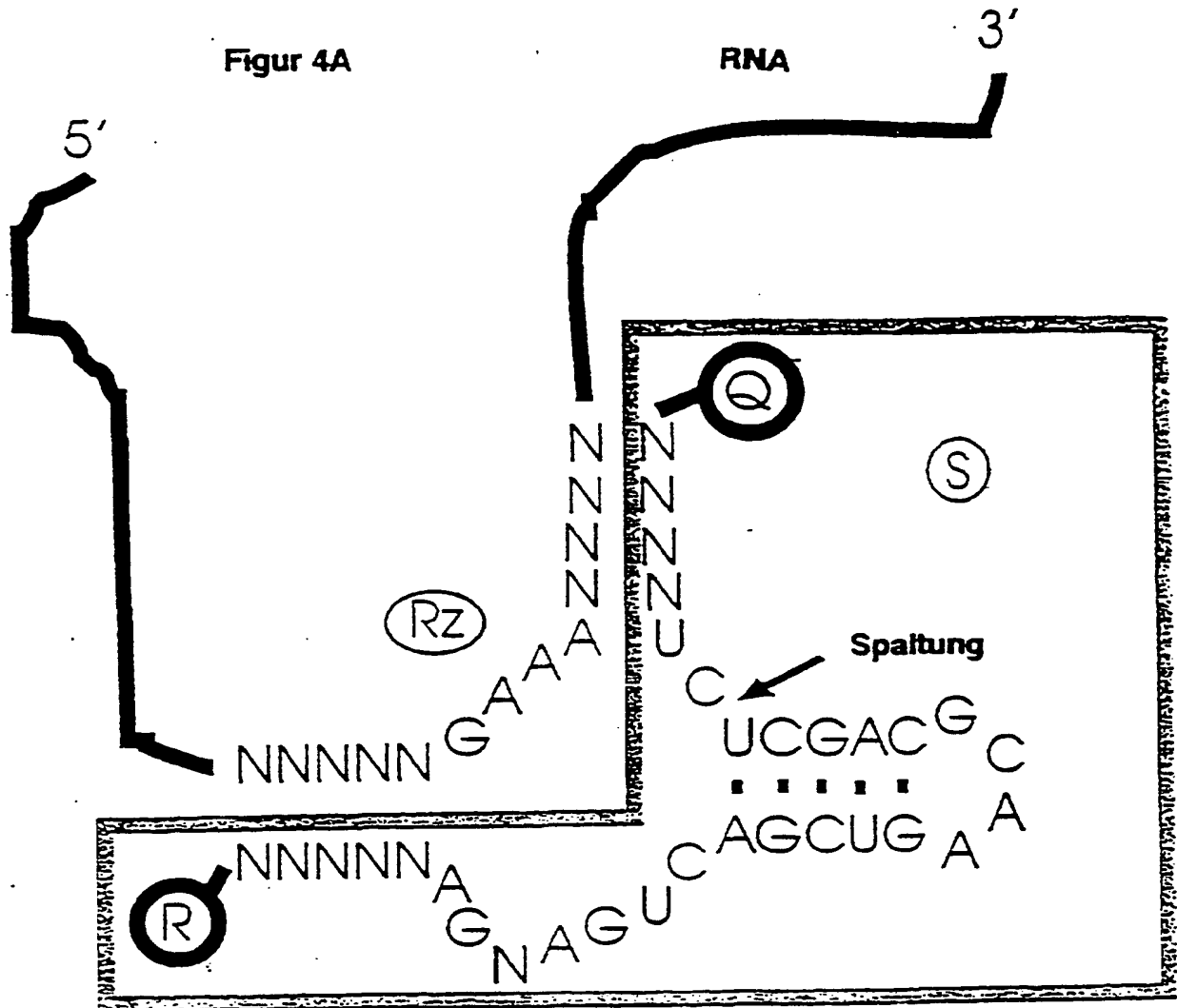
**Figur 2B**



Figur 3



Figur 4A



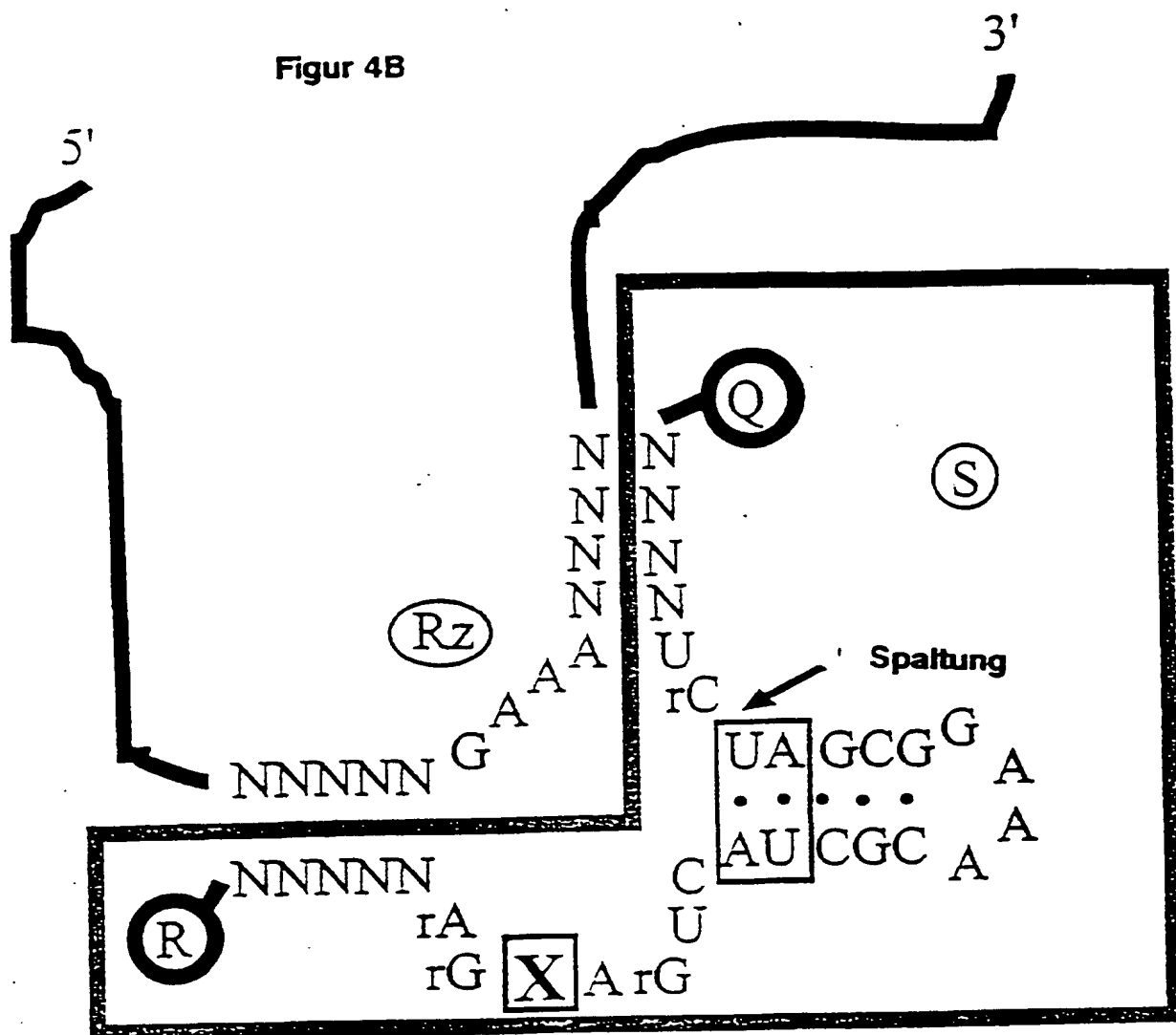
R = FAM  
HEX  
TET  
ALEXA

Q = TAMRA  
CY-5  
DABCYL  
LCR

etc.



Figur 4B



R = FAM  
 HEX  
 TET  
 ALEXA

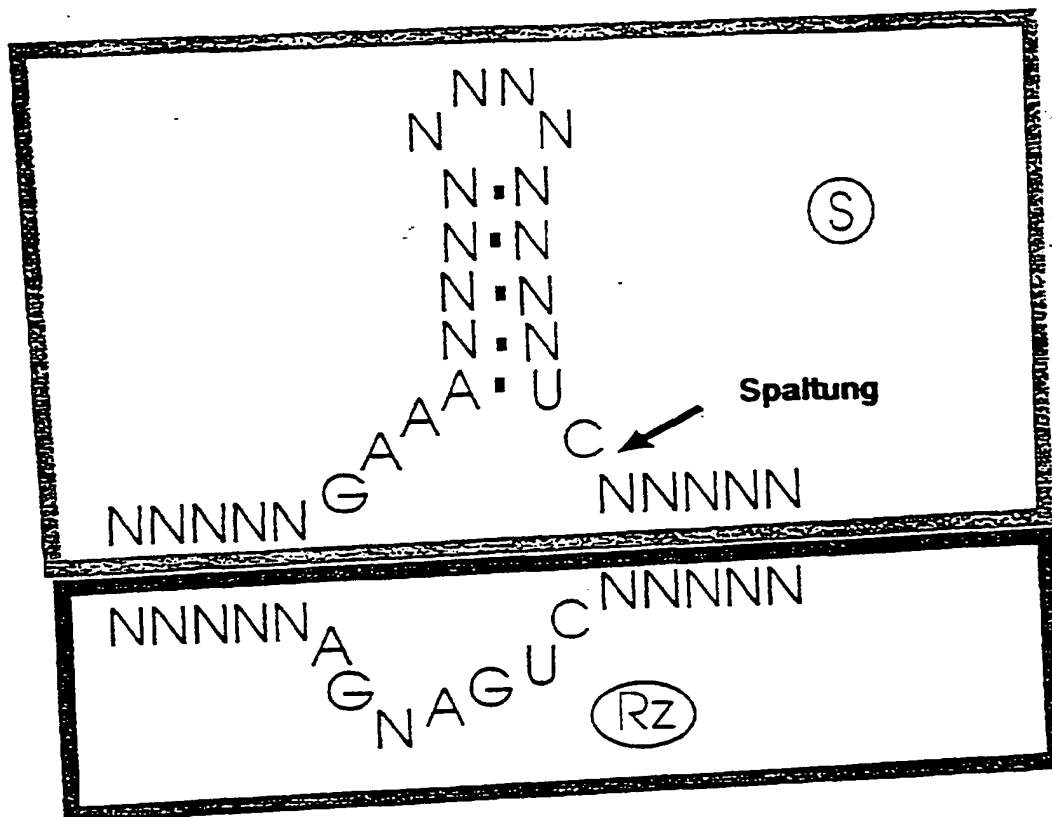
Q = TAMRA  
 CY-5  
 DABCYL  
 LCR

X = Pyridin-4-one

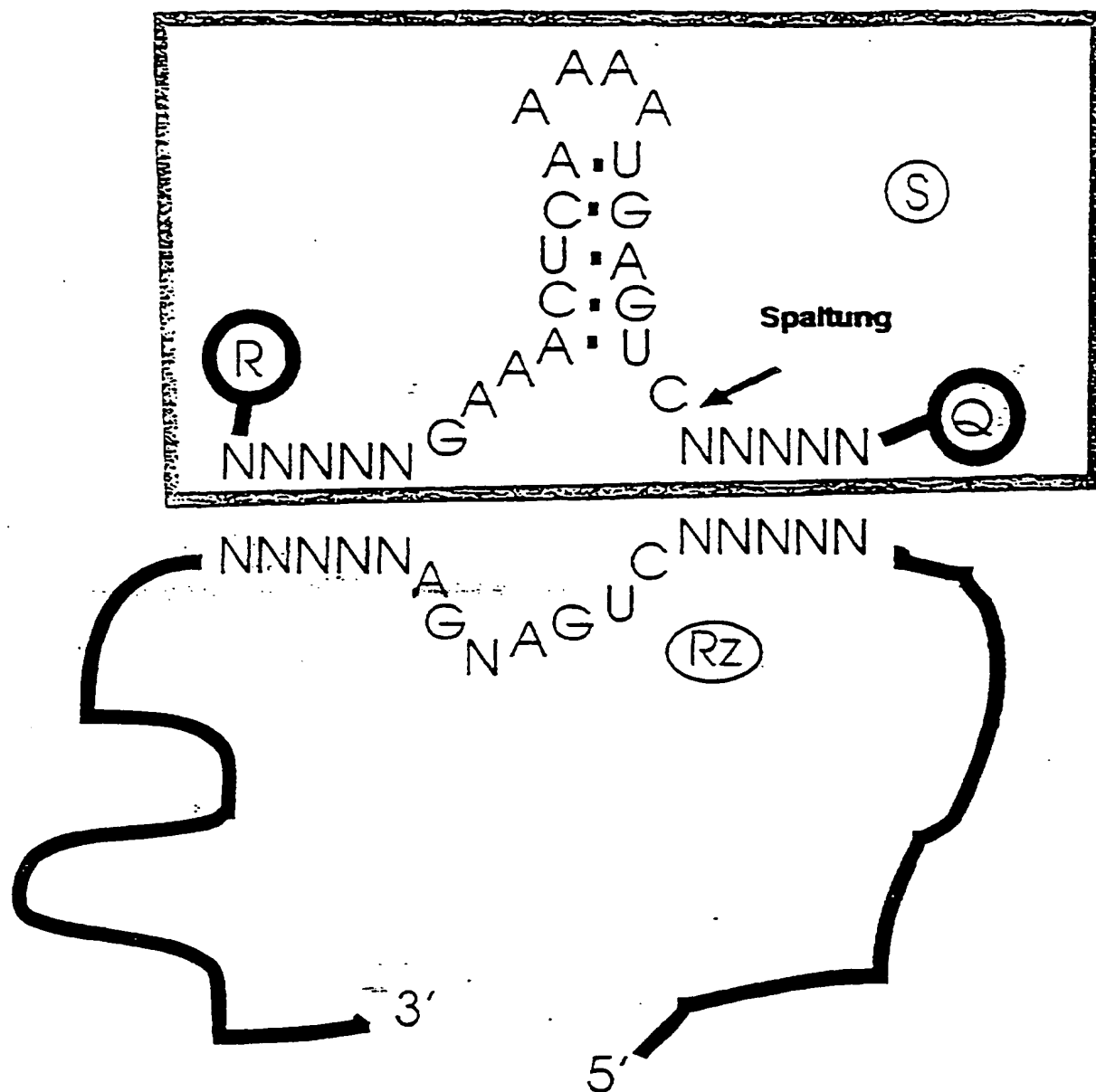
r = essentielle Ribonukleotide

wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop

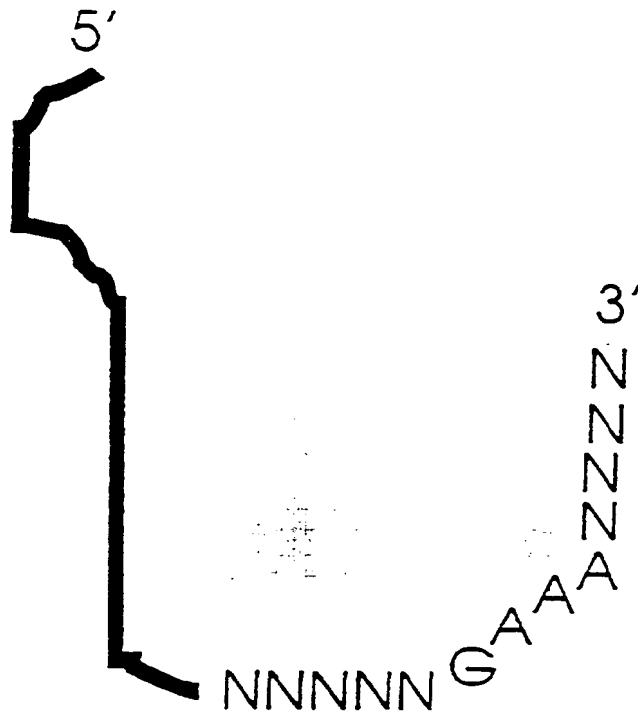
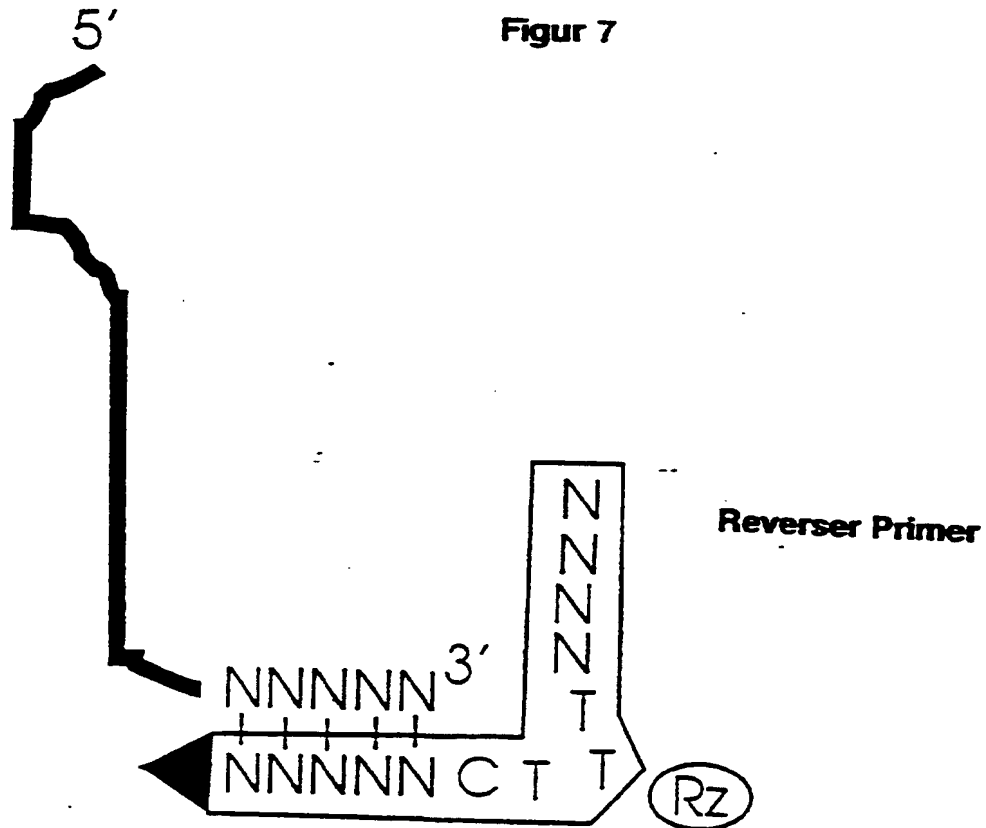
**Figur 5**



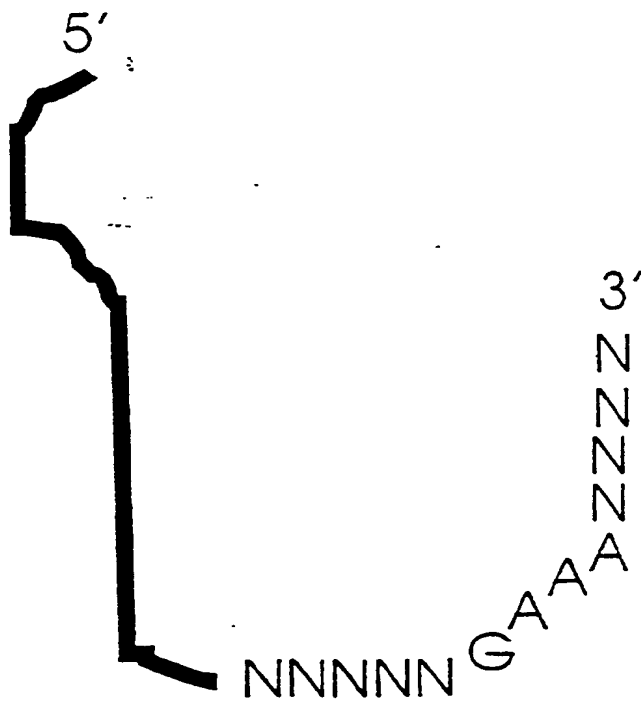
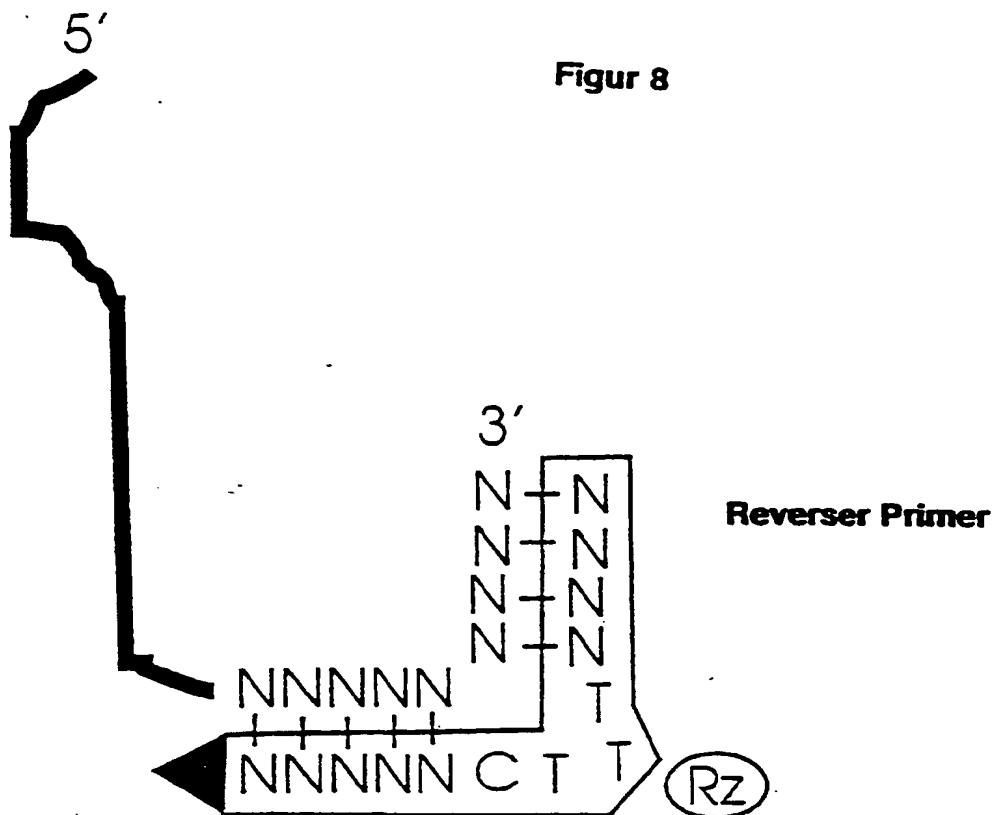
Figur 6



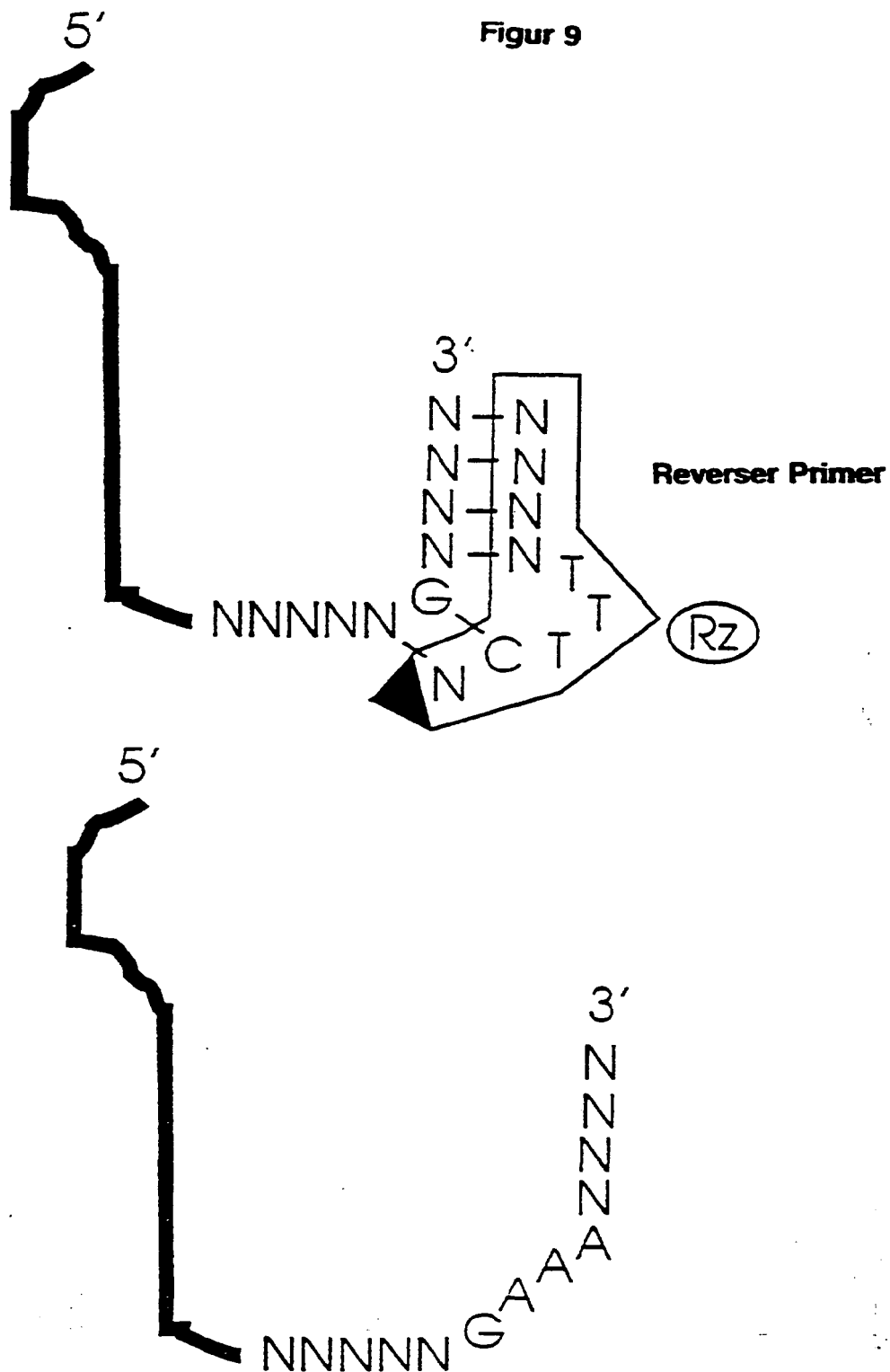
Figur 7



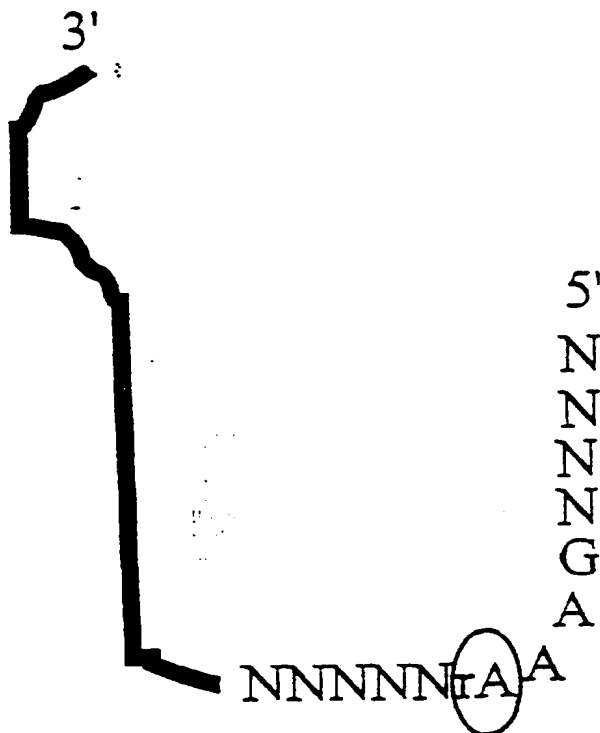
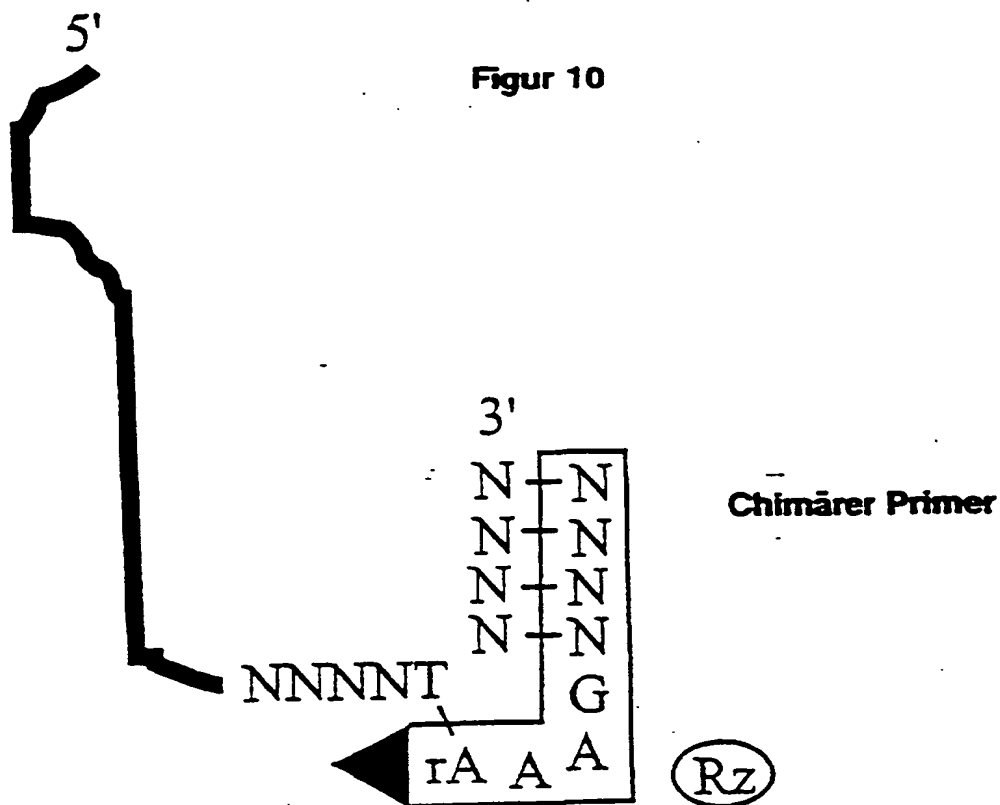
Figur 8



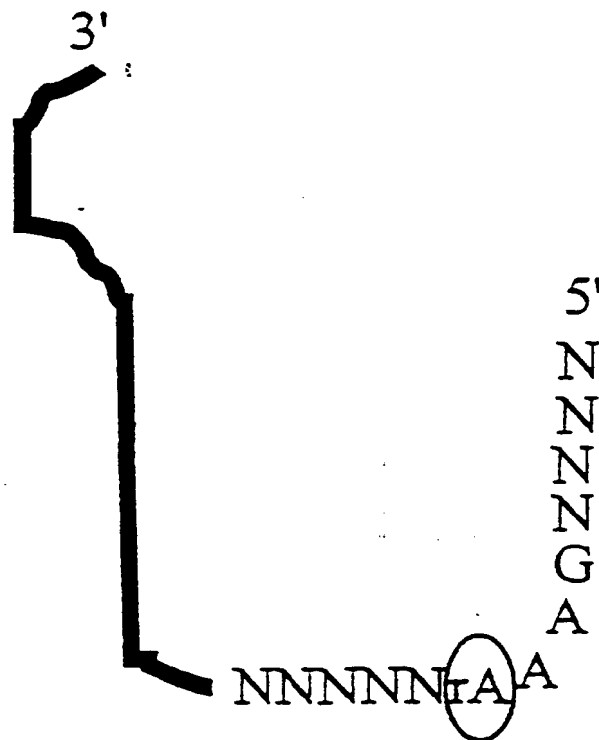
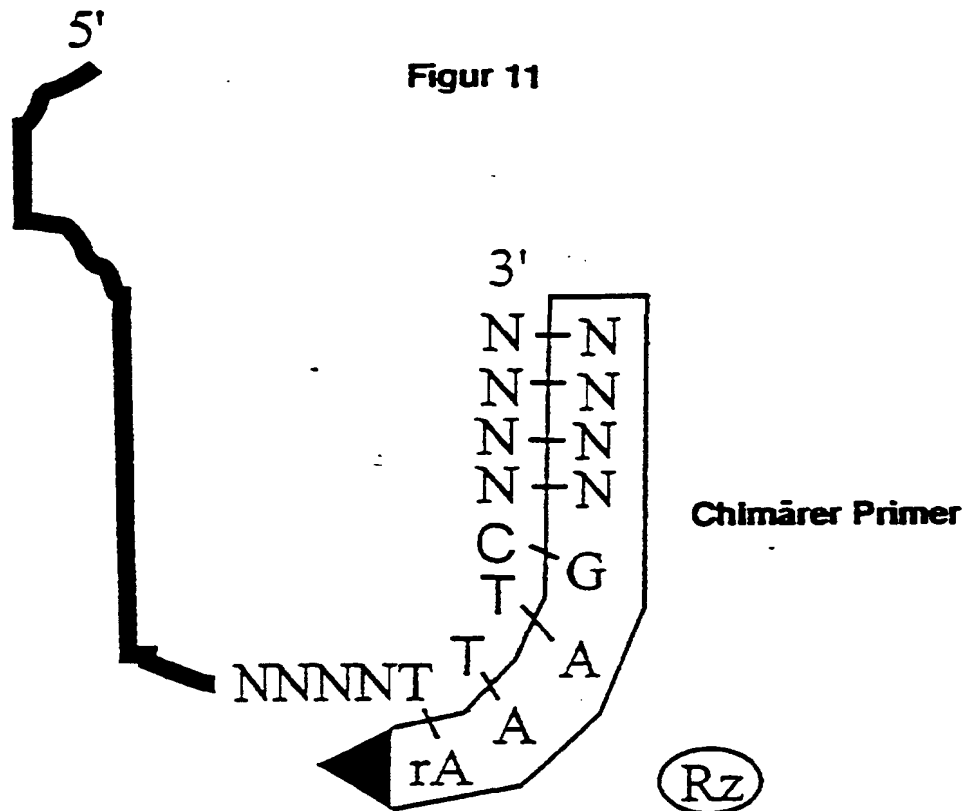
Figur 9



Figur 10

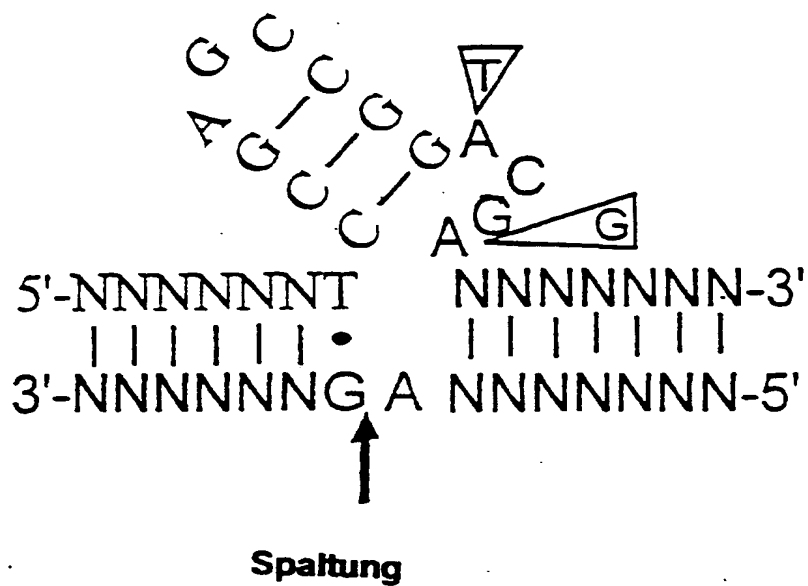


Figur 11

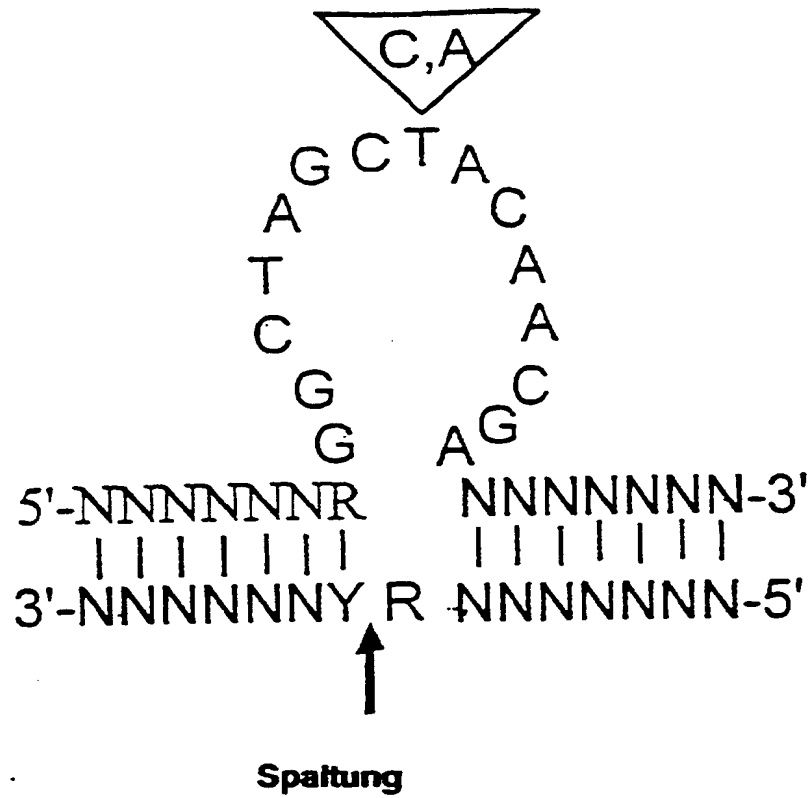




Figur 12

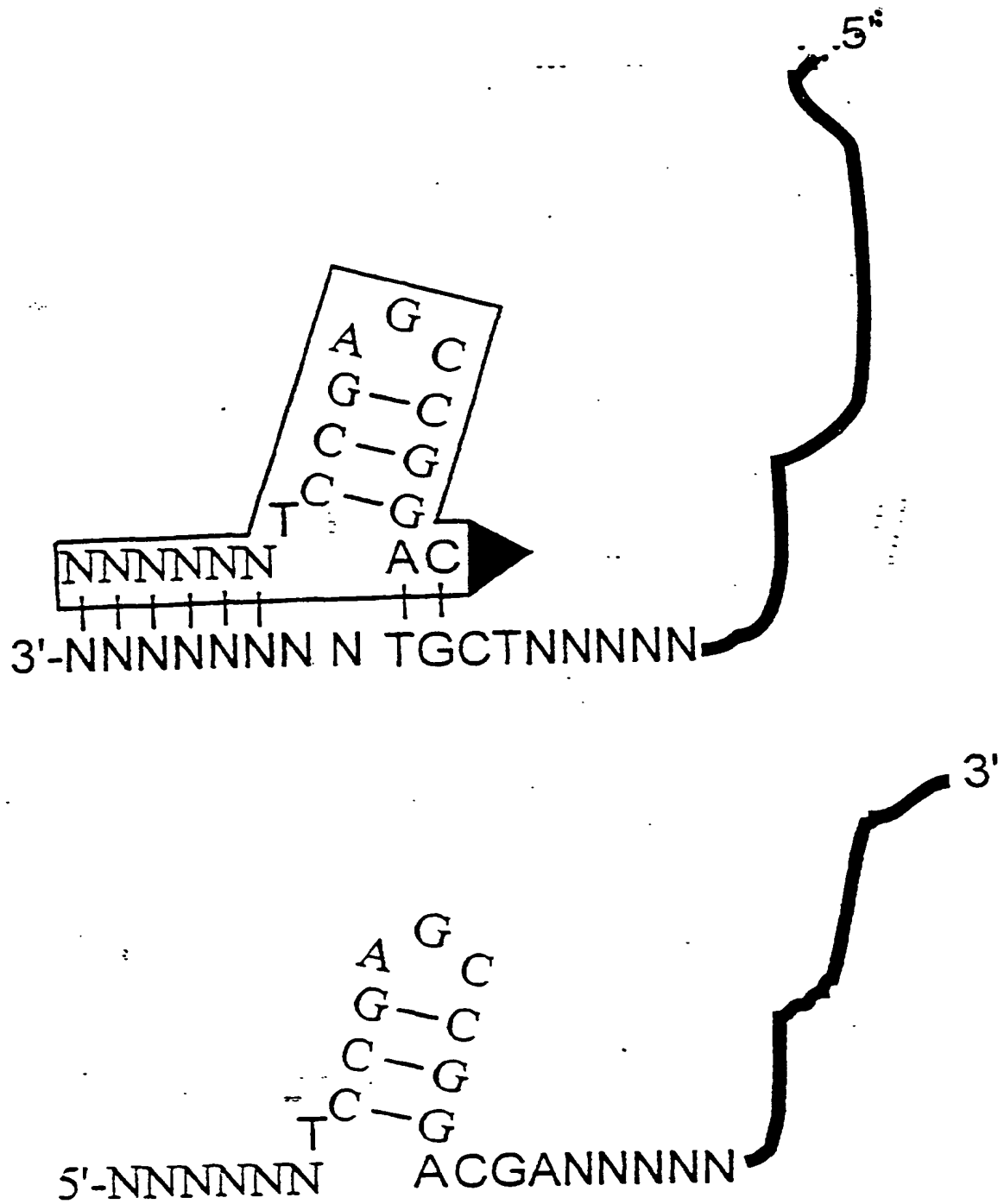


DNA-zymer: Prototype A



DNA-zyme: Prototype B

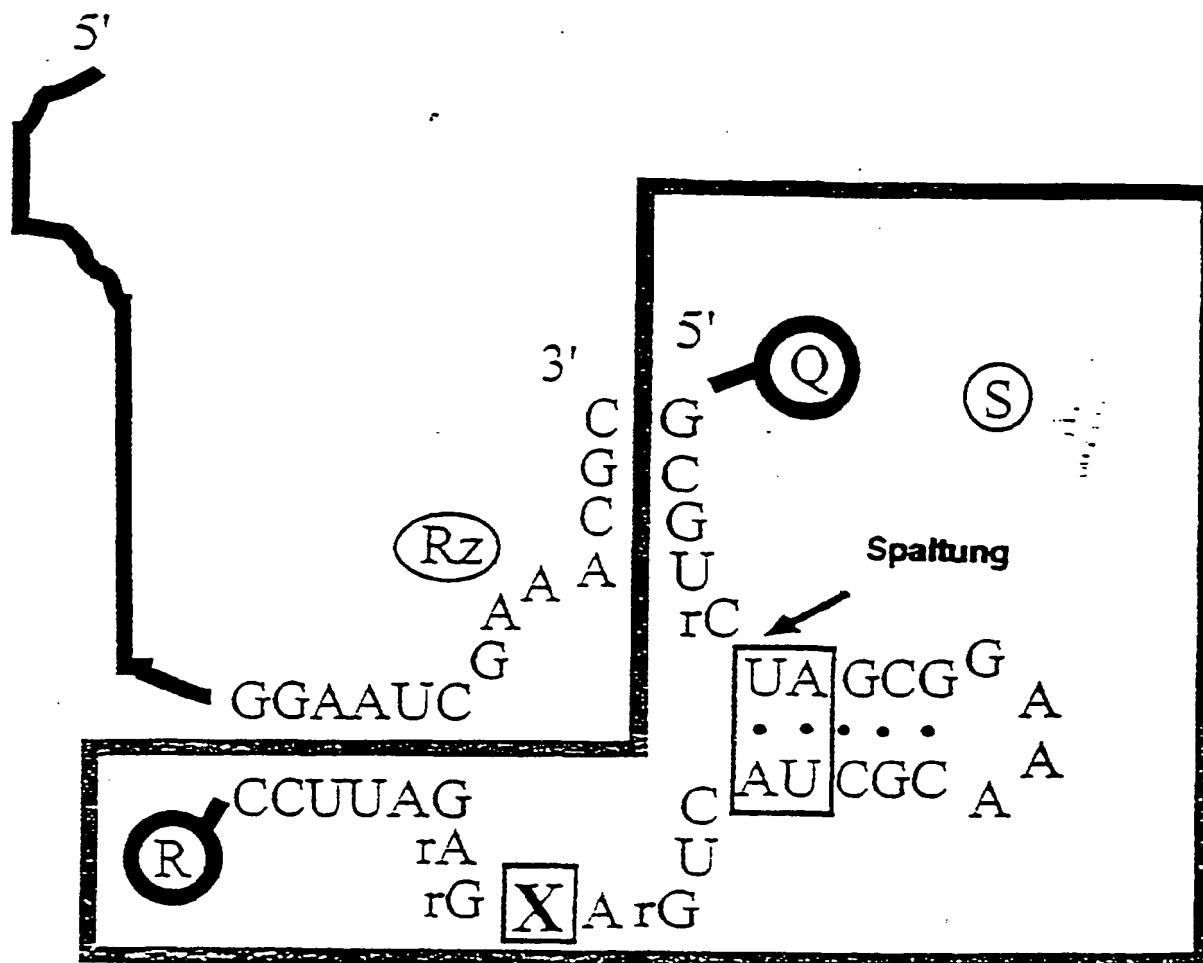
Figur 13



Figur 14

**Figur 15**

## Universelle Ribozymprobe



R = FAM  
HEX  
TET  
ALEXA

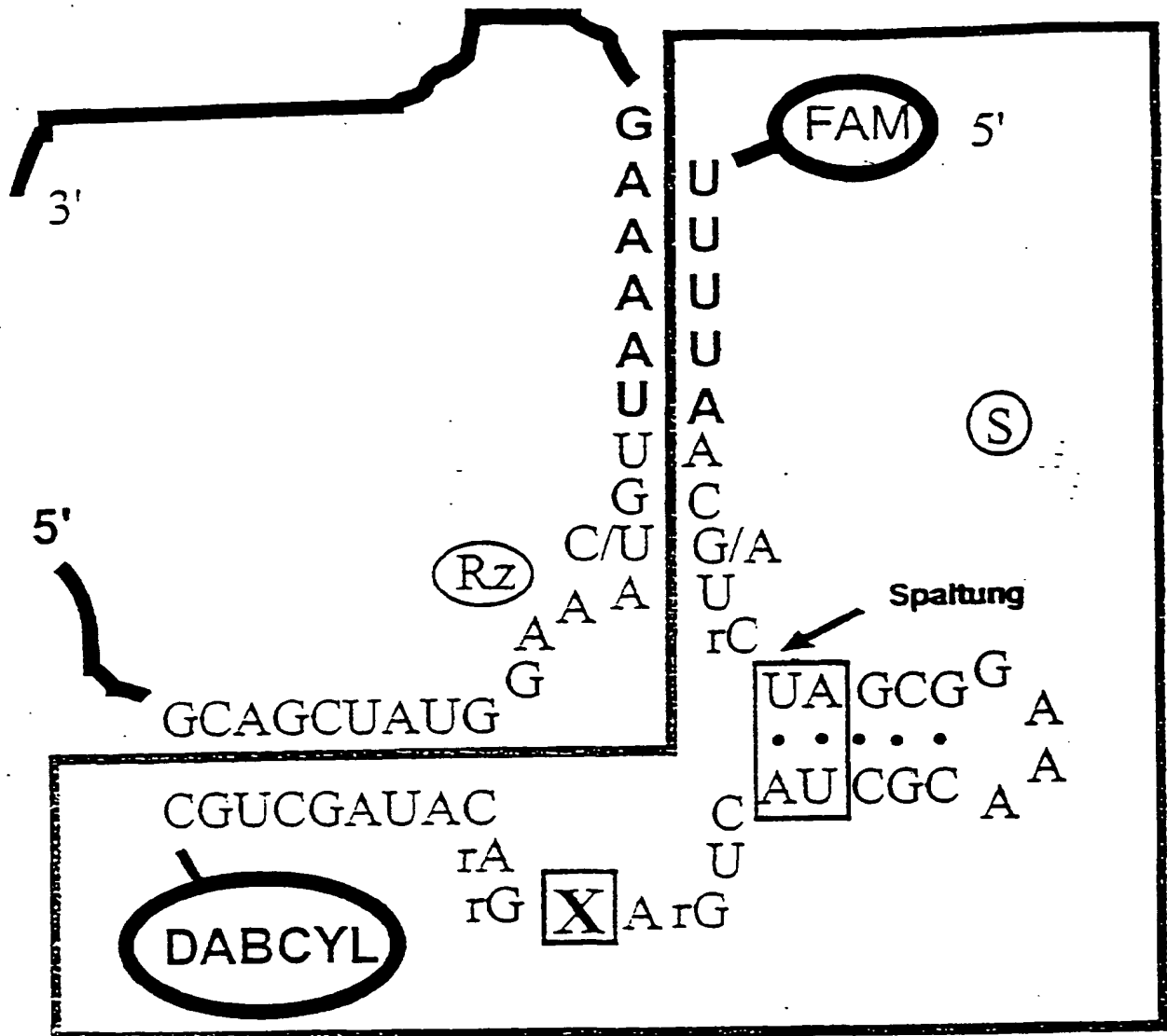
Q = TAMRA  
CY-5  
DABCYL  
LCR  
etc.

X = Pyridin-4-one

**r = essentielle Ribonukleotide**

**wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop**

## HIV Ribozymprobe

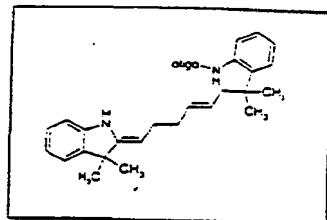
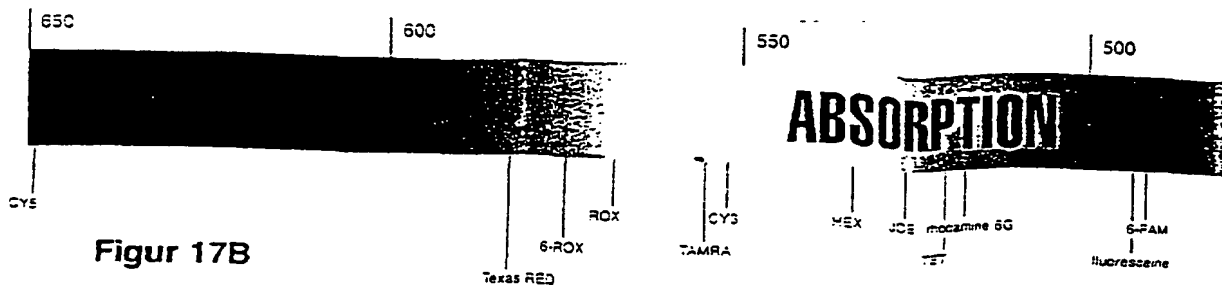


**X = Pyridin-4-one**

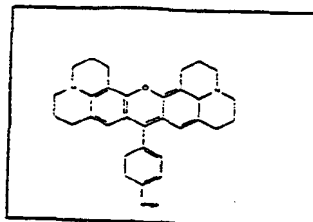
**r = essentielle Ribonukleotide**

**wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop**

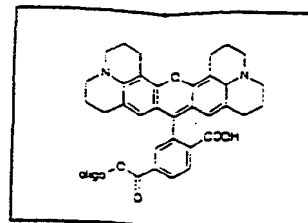
Figur 16



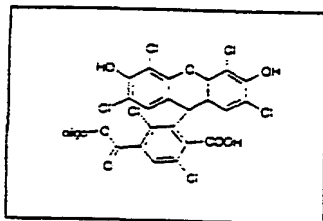
CYS  
 $\lambda_{\text{max}}: 651 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 674 \text{ nm}$



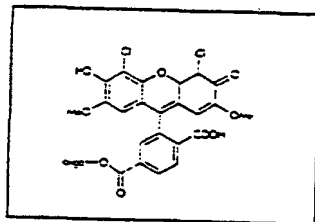
Texas Red  
 $\lambda_{\text{max}}: 583 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 603 \text{ nm}$



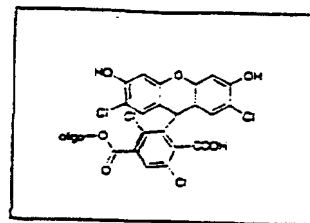
ROX (6-ROX)  
ROX:  $\lambda_{\text{max}}: 568 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 595 \text{ nm}$   
6-ROX:  $\lambda_{\text{max}}: 573 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 602 \text{ nm}$



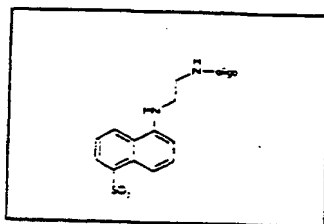
HEX  
 $\lambda_{\text{max}}: 535 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 556 \text{ nm}$



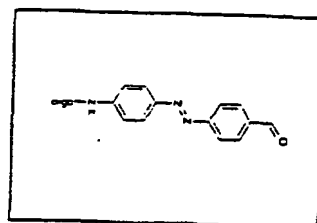
JOE  
 $\lambda_{\text{max}}: 527 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 548 \text{ nm}$



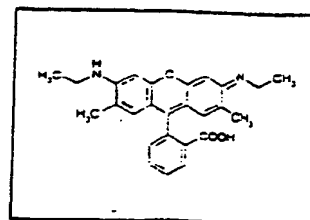
TET  
 $\lambda_{\text{max}}: 521 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 536 \text{ nm}$



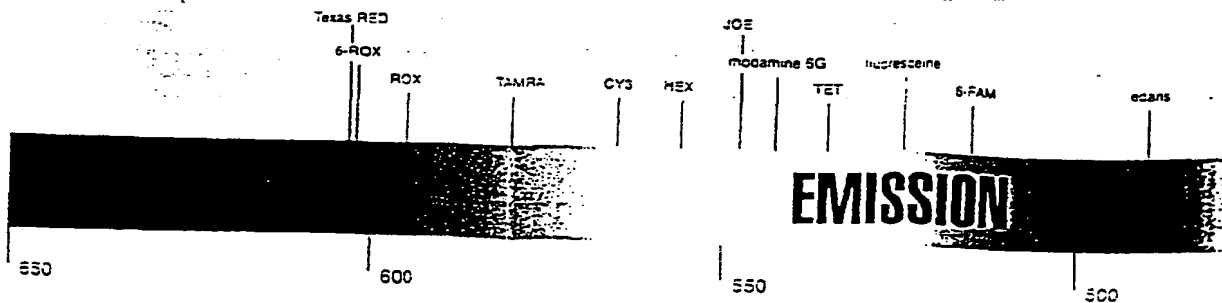
edans  
 $\lambda_{\text{max}}: 336 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 490 \text{ nm}$

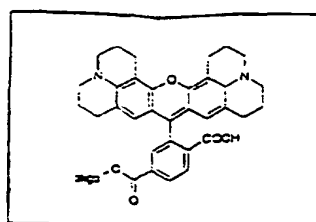
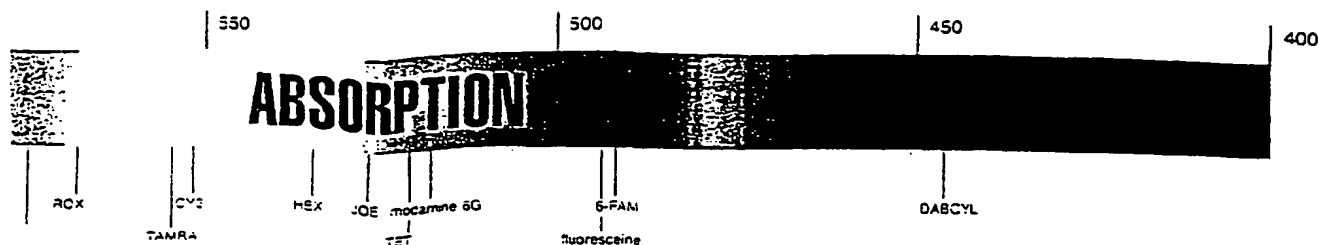


dansyl  
 $\lambda_{\text{max}}: 453 \text{ nm}$

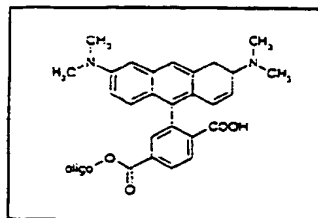


rhodamine 6G  
 $\lambda_{\text{max}}: 518 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{max}}: 543 \text{ nm}$

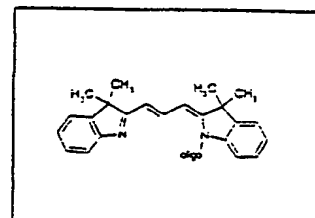




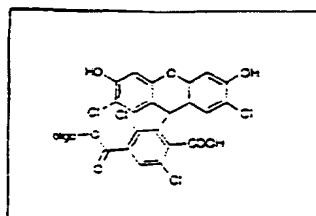
ROX (6-ROX)  
ROX:  $\lambda_{max,A}$ : 568 nm  $\lambda_{max,E}$ : 595 nm  
6-ROX:  $\lambda_{max,A}$ : 575 nm  $\lambda_{max,E}$ : 602 nm



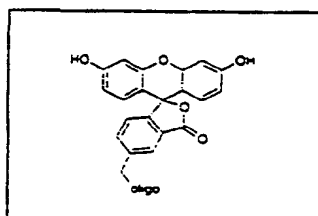
TAMRA  
 $\lambda_{max,A}$ : 555 nm  $\lambda_{max,E}$ : 580 nm



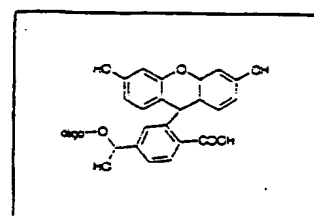
CY3  
 $\lambda_{max,A}$ : 552 nm  $\lambda_{max,E}$ : 565 nm



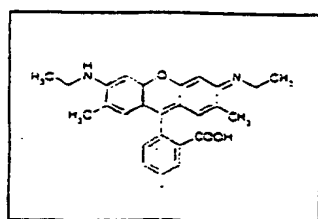
TET  
 $\lambda_{max,A}$ : 521 nm  $\lambda_{max,E}$ : 536 nm



fluorescein  
 $\lambda_{max,A}$ : 494 nm  $\lambda_{max,E}$ : 525 nm



6-FAM  
 $\lambda_{max,A}$ : 492 nm  $\lambda_{max,E}$ : 515 nm



rhodamine 6G  
 $\lambda_{max,A}$ : 518 nm  $\lambda_{max,E}$ : 543 nm

Figur 17A

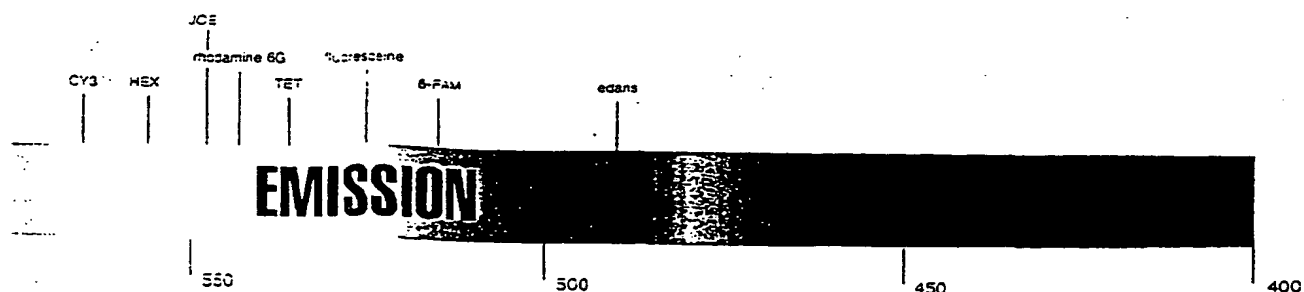


Fig. 17C

A (nm)	E (nm)	Farbstoffe
349 336	448 490	AMCA ADANS
495 505 494 496	503 513 515 516	BODIPY 493/503 BODIPY LF 6-FAM, Fluorescein 6-OREGON Green 488
521 518 531 528 527	536 543 545 547 548	TET Rhodamin 6G (6-R6G) BODIPY FL Br2 BODIPY R6G 6-JOE
535 535	552 555	BODIPY 530/550 HEX
552 559	565 569	Cy3 BODIPY 558/568
542 546 560	574 579 580	BODIPY TMR 542/574 5-TAMRA NED
575 583 588	602 603 616	6-ROX TEXAS Red BODIPY TR 589/617
630 625 646 651	640 640 660 674	Light Cycler RED 640 BODIPY 630/650 BODIPY 650/665 Cy5
700 678 685 685 743 787	710 703 705 705 767 807	Light Cycler Red Cy 5.5 IRD 700 La Jolla Blue Cy 7 IRD 41

A = Absorption

E = Emission



**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/31, C07K 14/31, 16/12, A61K 39/085, 48/00, G01N 33/68, 33/569, C12Q 1/68</b>	<b>A2</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 97/31114</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 28 August 1997 (28.08.97)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/GB97/00524 <b>(22) International Filing Date:</b> 25 February 1997 (25.02.97)  <b>(30) Priority Data:</b> 9604045.6                      26 February 1996 (26.02.96)      GB  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB/GB]; New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> BURNHAM, Martin, Karl, Russell [GB/US]; SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 1250 South Collegeville Road, P.O. Box 5089, Collegeville, PA 19426-0989 (US). HODGSON, John, Edward [GB/US]; SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 1250 South Collegeville Road, P.O. Box 5089, Collegeville, PA 19426-0989 (US).  <b>(74) Agent:</b> GIDDINGS, Peter, John; SmithKline Beecham, Corporate Intellectual Property, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).		<b>(81) Designated States:</b> JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
<b>(54) Title:</b> POLYNUCLEOTIDES AND AMINOACID SEQUENCES FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS  <b>(57) Abstract</b>  This invention relates to Staphylococcal polynucleotides, polypeptides encoded by such polynucleotides, the uses of such polynucleotides and polypeptides, as well as the production of such polynucleotides and polypeptides and recombinant host cells transformed with the polynucleotides. This invention also relates to inhibiting the biosynthesis or action of such polynucleotides or polypeptides and to the use of such inhibitors in therapy.		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**b) Isolation of *Staphylococcus aureus* WCUH29 RNA from infected tissue samples**

4-6 infected tissue samples (each approx 0.5-0.7g) in 2ml screw-cap tubes are removed from -80°C storage into a dry ice ethanol bath. In a microbiological safety cabinet the samples are disrupted individually whilst the remaining samples are kept cold in the dry ice ethanol bath. To disrupt the bacteria within the tissue sample 1ml of TRIzol Reagent (Gibco BRL, Life Technologies) is added followed by enough 0.1mm zirconia/silica beads to almost fill the tube, the lid is replaced taking care not to get any beads into the screw thread so as to ensure a good seal and eliminate aerosol generation. The sample is then homogenised in a Mini-BeadBeater Type BX-4 (Biospec Products). Necrotic fatty tissue is treated for 100 seconds at 5000 rpm in order to achieve bacterial lysis. *In vivo* grown bacteria require longer treatment than *in vitro* grown *S. aureus* WCUH29 which are disrupted by a 30 second bead-beat.

After bead-beating the tubes are chilled on ice before opening in a fume-hood as heat generated during disruption may degrade the TRIzol and release cyanide.

200 microlitres of chloroform is then added and the tubes shaken by hand for 15 seconds to ensure complete mixing. After 2-3 minutes at room temperature the tubes are spun down at 12,000 x g, 4 °C for 15 minutes and RNA extraction is then continued according to the method given by the manufacturers of TRIzol Reagent i.e.: The aqueous phase, approx 0.6 ml, is transferred to a sterile eppendorf tube and 0.5 ml of isopropanol is added. After 10 minutes at room temperature the samples are spun at 12,000 x g, 4 °C for 10 minutes. The supernatant is removed and discarded then the RNA pellet is washed with 1 ml 75% ethanol. A brief vortex is used to mix the sample before centrifuging at 7,500 x g, 4 °C for 5 minutes. The ethanol is removed and the RNA pellet dried under vacuum for no more than 5 minutes. Samples are then resuspended by repeated pipetting in 100 microlitres of DEPC treated water, followed by 5-10 minutes at 55 °C. Finally, after at least 1 minute on ice, 200 units of Rnasin (Promega) is added.

RNA preparations are stored at -80 °C for up to one month. For longer term storage the RNA precipitate can be stored at the wash stage of the protocol in 75% ethanol for at least one year at -20 °C.

Quality of the RNA isolated is assessed by running samples on 1% agarose gels. 1 x TBE gels stained with ethidium bromide are used to visualise total RNA yields. To demonstrate the isolation of bacterial RNA from the infected tissue 1 x MOPS, 2.2M formaldehyde gels are run and vacuum blotted to Hybond-N (Amersham). The blot is then

hybridised with a  $^{32}$ P labelled oligonucleotide probe specific to 16s rRNA of *S.aureus* (K.Greisen, M. Loeffelholz, A. Purohit and D. Leong. J.Clin. (1994) Microbiol. 32 335-351). An oligonucleotide of the sequence:-

5'-gctcctaaaagggttactccaccggc-3' [SEQ ID NO:91]

5 is used as a probe. The size of the hybridising band is compared to that of control RNA isolated from *in vitro* grown *S.aureus* WCUH29 in the Northern blot. Correct sized bacterial 16s rRNA bands can be detected in total RNA samples which show extensive degradation of the mammalian RNA when visualised on TBE gels.

**c) The removal of DNA from Staphylococcus aureus WCUH29 derived RNA**

10 DNA was removed from 73 microlitre samples of RNA by a 15 minute treatment on ice with 3 units of DNAaseI, amplification grade (Gibco BRL, Life Technologies) in the buffer supplied with the addition of 200 units of Rnasin (Promega) in a final volume of 90 microlitres.

The DNAase was inactivated and removed by treatment with TRIzol LS Reagent  
15 (Gibco BRL, Life Technologies) according to the manufacturers protocol. DNAase treated RNA was resuspended in 73 microlitres of DEPC treated water with the addition of Rnasin as described in Method 1.

**d) The preparation of cDNA from RNA samples derived from infected tissue**

10 microlitre samples of DNAase treated RNA are reverse transcribed using a  
20 SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis kit (Gibco BRL, Life Technologies) according to the manufacturers instructions. 1 nanogram of random hexamers is used to prime each reaction. Controls without the addition of SuperScriptII reverse transcriptase are also run. Both +/-RT samples are treated with RNaseH before proceeding to the PCR reaction

25 **e) The use of PCR to determine the presence of a bacterial cDNA species**

PCR reactions are set up on ice in 0.2ml tubes by adding the following components:

45 microlitres PCR SUPERMIX (Gibco BRL, Life Technologies).  
1 microlitre 50mM MgCl<sub>2</sub>, to adjust final concentration to 2.5mM.  
30 1 microlitre PCR primers (optimally 18-25 basepairs in length and designed to possess similar annealing temperatures), each primer at 10mM initial concentration.  
2 microlitres cDNA.

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

```

Gly Thr Ser Val Ser Leu Gly Gly Ile Leu Ile His Arg Thr Pro Ile
 1             5             10             15
Leu Ile Leu Asp Glu Pro Leu Ala Asn Leu Asp Pro Ala Thr Gly His
      20             25             30
Glu Thr Leu Arg Leu Leu Xaa Asn Ile His Glu Glu Thr Lys Ser Thr
      35             40             45
Met Ile Ile Val Glu His Arg Leu Glu Xaa Ser Leu Asp Asp Thr Phe
      50             55             60
Asp Arg Xaa Leu Leu Phe Lys Asp Gly Lys Ile Ile Ala Asn Thr Thr
      65             70             75             80
Pro Ser Asp Leu Leu Lys Ser Ser Lys Leu Lys Glu Ala Gly Ile Arg
      85             90             95
Val Pro Leu Tyr Cys Xaa Ala Leu Xaa Tyr Xaa Glu Val Asp Val Glu
      100            105            110
Ser Ile Asp Asn Leu Ala Xaa Leu Arg Val Val Cys Met Ser Glu His
      115            120            125
Val Lys Xaa Lys Val Xaa Lys Trp Ile Asp Xaa Thr Ser Ala His Asn
      130            135            140
Asp Asn Lys Tyr Thr Ser Xaa Pro Leu Leu Glu Leu Asn Glu Val Cys
      145            150            155            160
Val Gln Tyr Ser Asp Tyr Ser Asn Ser Val Leu Asn Asn Val Gln Leu
      165            170            175
Asn Val Tyr Arg Arg Glu Met Leu Ser Ile Val Gly His Asn Gly Ala
      180            185            190
Xaa Xaa Ser Thr Leu Ala Lys Ala Ile Cys Gly Phe Leu Asp Ile Thr
      195            200            205
Gly Asn Ile Gln Phe Cys Asn Arg Gly Phe Asn Gln Leu Ser Ile Ser
      210            215            220
Glu Arg Ser
      225

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Genomic DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

GCTCCTAAAA GGTTACTCCA CCGGC

25

**What is claimed is:**

1. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:
  - (a) a polynucleotide having at least a 70% identity to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos: 1,4,7,10,13,16,19,22,25 and 28;
  - (b) a polynucleotide which is complementary to the polynucleotide of (a); and
  - (c) a polynucleotide comprising at least 15 sequential bases of the polynucleotide of (a) or (b).
2. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is DNA.
3. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is RNA.
4. The polynucleotide of Claim 2 comprising the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos: 1,4,7,10,13,16,19,22,25 and 28.
5. An isolated polynucleotide comprising a member selected from the group consisting of:
  - (a) a polynucleotide having at least a 70% identity to a polynucleotide encoding the polypeptide expressed contained in NCIMB Deposit No. 40771 and selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1,4,7,10,13,16,19,22,25 and 28;
  - (b) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of (a); and
  - (c) a polynucleotide comprising at least 15 bases of the polynucleotide of (a) or (b).
6. A vector comprising the DNA of Claim 2.
7. A host cell comprising the vector of Claim 6.
8. A process for producing a polypeptide comprising: expressing from the host cell of Claim 7 a polypeptide encoded by said DNA.
9. A process for producing a cell which expresses a polypeptide comprising transforming or transfecting the cell with the vector of Claim 6 such that the cell expresses the polypeptide encoded by the cDNA contained in the vector.
10. A process for producing a polypeptide of the invention or fragment comprising culturing a host of claim 7 under conditions sufficient for the production of said polypeptide or fragment.
11. A polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting essentially of: 79,80,81,82,83,84,85,86,87 and 88.

12. An antibody against the polypeptide of claim 11.
13. An antagonist which inhibits the activity of the polypeptide of claim 11.
14. A method for the treatment of an individual having need of a polypeptide of the invention comprising: administering to the individual a therapeutically effective amount of the polypeptide of claim 11.
15. The method of Claim 14 wherein said therapeutically effective amount of the polypeptide is administered by providing to the individual DNA encoding said polypeptide and expressing said polypeptide *in vivo*.
16. A method for the treatment of an individual having need to inhibit a polypeptide of the invention comprising: administering to the individual a therapeutically effective amount of the antagonist of Claim 13.
17. A process for diagnosing a disease related to expression of the polypeptide of claim 11 comprising:  
determining a nucleic acid sequence encoding said polypeptide.
18. A diagnostic process comprising: analyzing for the presence of the polypeptide of claim 11 in a sample derived from a host.
19. A method for identifying compounds which bind to and inhibit an activity of the polypeptide of claim 11 comprising:  
contacting a cell expressing on the surface thereof a binding for the polypeptide, said binding being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said binding, with a compound to be screened under conditions to permit binding to the binding; and  
determining whether the compound binds to and activates or inhibits the binding by detecting the presence or absence of a signal generated from the interaction of the compound with the binding.
20. A method for inducing an immunological response in a mammal which comprises inoculating the mammal with a polypeptide of the invention, or a fragment or variant thereof, adequate to produce antibody to protect said animal from disease.
21. A method of inducing immunological response in a mammal which comprises, through gene therapy, delivering gene encoding a fragment of a polypeptide of the invention or a variant thereof, for expressing such polypeptide, or a fragment or a variant thereof *in vivo* in order to induce an immunological response to produce antibody to protect said animal from disease.



22. An immunological composition comprising a DNA which codes for and expresses a polynucleotide of the invention or protein coded therefrom which, when introduced into a mammal, induces an immunological response in the mammal to a given such polynucleotide or protein coded therefrom.
- 5           23. A polynucleotide consisting essentially of a DNA sequence obtainable by screening an appropriate library containing the complete gene for a polynucleotide sequence of the invention under stringent hybridization conditions with a probe having the sequence of said polynucleotide sequence or a fragment thereof, and isolating said DNA sequence.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/31, C07K 14/31, 16/12, A61K 39/085, 48/00, G01N 33/68, 33/569, C12Q 1/68</b>	<b>A3</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 97/31114</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 28 August 1997 (28.08.97)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/GB97/00524 <b>(22) International Filing Date:</b> 25 February 1997 (25.02.97) <b>(30) Priority Data:</b> 9604045.6 26 February 1996 (26.02.96) GB <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB/GB]; New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB). <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> BURNHAM, Martin, Karl, Russell [GB/US]; SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 1250 South Collegeville Road, P.O. Box 5089, Collegeville, PA 19426-0989 (US). HODGSON, John, Edward [GB/US]; SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 1250 South Collegeville Road, P.O. Box 5089, Collegeville, PA 19426-0989 (US). <b>(74) Agent:</b> GIDDINGS, Peter, John; SmithKline Beecham, Corporate Intellectual Property, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).	<b>(81) Designated States:</b> JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>  <b>(88) Date of publication of the international search report:</b> 23 October 1997 (23.10.97)	
<b>(54) Title:</b> POLYNUCLEOTIDES AND AMINOACID SEQUENCES FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS  <b>(57) Abstract</b>  This invention relates to Staphylococcal polynucleotides, polypeptides encoded by such polynucleotides, the uses of such polynucleotides and polypeptides, as well as the production of such polynucleotides and polypeptides and recombinant host cells transformed with the polynucleotides. This invention also relates to inhibiting the biosynthesis or action of such polynucleotides or polypeptides and to the use of such inhibitors in therapy.		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Internal Application No  
PCT/GB 97/00524

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

## 11) Claims 11-23 all partially:

Polypeptide as in Seq.ID:84, antibodies, antagonists. Therapeutic applications of said polypeptide, of the encoding polynucleotide and of the antagonists. Application of said polynucleotide and polypeptide in diagnostics. Application of said polypeptide for screening of ligands/inhibitors.

12) Claims 11-23 all partially:  
same as 11) but referred to Seq.ID:85.

13) Claims 11-23 all partially:  
same as 11) but referred to Seq.ID:86.

14) Claims 11-23 all partially:  
same as 11) but referred to Seq.ID:87.

15) Claims 11-23 all partially:  
same as 11) but referred to Seq.ID:88.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/GB 97/00524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9422895 A	13-10-94	US 5470716 A	28-11-95
		US 5476767 A	19-12-95
		AU 6623294 A	24-10-94
		US 5585465 A	17-12-96
-----			
WO 9400493 A	06-01-94	US 5330754 A	19-07-94
		AU 4651193 A	24-01-94
		EP 0649435 A	26-04-95
		JP 7508649 T	28-09-95
		US 5559011 A	24-09-96
-----			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**